

Podridão da castanha em Trás-os-Montes: caracterização morfológica, ecofisiológica e molecular do agente causal *Gnomoniopsis smithogilvyi*

Guilherme Possamai

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito
do duplo diploma da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná*

Orientado por

Paula Cristina Azevedo Rodrigues

Rosângela Dallemole Giaretta

**Bragança
2020**

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do projeto “ValorCast – Valorização da castanha e otimização da sua comercialização”, código do projeto: PDR2020-1.0.1-FEADER-032034. Fundado pelo Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER) e pelo Governo Português, no âmbito da Ação 1.1 Grupos Operacionais, Medida 1. Inovação, PDR 2020 – Programa de Desenvolvimento Rural do Continente.



ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENQUADRAMENTO	1
1.2. OBJETIVOS	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. CASTANHA – ENQUADRAMENTO GLOBAL.....	3
2.1.1. Castanha em Portugal	4
2.2. BIOLOGIA DO CASTANHEIRO EUROPEU	5
2.2.1. Variedades de Castanheiro Europeu em Trás-os-Montes	6
2.3. PRODUÇÃO DA CASTANHA – FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE	7
2.3.1. Pragas	8
2.3.2. Podridões.....	9
2.4. PODRIDÃO CASTANHA – <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	11
2.4.1. Biologia e Ecologia do Patógeno	14
2.4.2. Sintomologia e Diagnose da Doença	14
2.5. MÉTODOS DE CONTROLE DE PODRIDÕES.....	16
2.5.1. Controle de <i>G. smithogilvyi</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	18
3.1.1. Material Biológico	18
<i>Castanhas</i>	18
<i>Fungos</i>	18
3.1.2. Desenho Experimental	19
3.1.3. Preparação das Castanhas	19
3.1.4. Preparação das Suspensões de Esporos	20
3.1.5. Inoculação das Castanhas e Incubação	20
3.1.6. Avaliação da Taxa de Infecção das Castanhas Inoculadas com <i>G. smithogilvyi</i>	22
3.1.7. Verificação dos Postulados de Koch.....	22
3.1.8. Determinação da Taxa de Infecção Natural das Castanhas ..	22
3.2. CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E ECOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS PORTUGUESES DE <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	23
3.2.1. Material Biológico	24

3.2.2. Preparação dos Meios de Cultura	24
3.2.3. Estudos de Taxonomia	25
<i>Inoculação dos isolados</i>	25
<i>Medição de conidiomata e de conídios</i>	25
3.2.4. Caracterização Ecofisiológica.....	26
<i>Contagem de esporos</i>	27
3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE	
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	27
3.3.1. Extração do DNA.....	27
3.3.2. Eletroforese do DNA	28
3.3.3. Amplificação do DNA por PCR	28
3.3.4. Purificação e Sequenciação dos Produtos de PCR	29
3.3.5. Análise filogenética dos isolados de <i>G. smithogilvyi</i>	29
3.4. TESTE DE CRESCIMENTO EM CO-CULTURA COM <i>Trichoderma</i>	
<i>viridescens</i>	32
3.4.1. Material Biológico	32
3.4.2. Desenho Experimental	32
3.4.3. Montagem do Teste de Co-cultura e Medição	32
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. ESTUDOS DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE	
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> EM CASTANHA	35
4.1.1. Nível de Infecção Natural das Castanhas	35
4.1.2. Nível de Infecção das Castanhas Inoculadas com <i>G.</i>	
<i>smithogilvyi</i>	38
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS PORTUGUESES DE	
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	45
4.2.1. Caracterização Morfológica e Taxonômica	45
<i>Conidiomata</i>	46
<i>Conídios</i>	47
4.2.2. Caracterização Ecofisiológica.....	50
<i>Duração da fase lag</i>	51
<i>Taxa média de crescimento</i>	52
<i>Produção de conídios</i>	54
<i>Conclusões da ecofisiologia de G. smithogilvyi</i>	55
4.2.3. Caracterização Molecular	55
4.3. TESTES DE BIOCONTROLE.....	58
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	74

AGRADECIMENTOS

Tenho prazer em expressar minha imensa gratidão a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Paula Cristina Azevedo Rodrigues, primeiramente por me aceitar na qualidade de seu aluno e acreditar no meu potencial, mas sobretudo, por me fornecer o incentivo, a inspiração e todo o apoio que necessitei no decorrer do desenvolvimento desta pesquisa.

Sem sua orientação este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado.

Também sou muito grato a minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Dallemole Giaretta, por ter despertado em mim a curiosidade e a admiração pela microbiologia e pela fitopatologia no decorrer de toda a minha graduação, o que me fez chegar onde estou. Agradeço também suas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Agradecimentos especiais a minha família, minha mãe Roseli, meu pai Rogerio e meu padrasto Solano, por possibilitarem minha ida a Portugal, e pelo apoio incondicional sempre. Amo vocês. Também agradeço aos meus irmãos, Marcela e Paulo, e espero de alguma forma inspirá-los a realizarem seus sonhos.

Também gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB), pelo caloroso acolhimento e apoio. Bem como ao CIMO (Centro de Investigação da Montanha), e aos laboratórios de biologia e microbiologia da ESA (Escola Superior Agrária do IPB) pelo fornecimento de utensílios e equipamentos.

Agradeço também à indústria Sortegel, Sortes, Bragança, pelo fornecimento das castanhas utilizadas no estudo.

Não sendo menos importante, agradeço finalmente a todos os amigos e colegas que me auxiliaram neste projeto, tanto brasileiros de longa data, quanto todos aqueles que tive o privilégio e o prazer de conhecer durante minha estadia em Bragança. Muito obrigado Arij, Bárbara e Ana Flávia, pelo apoio mais que fundamental. Por último, àqueles que não foram mencionados, mas que indiretamente contribuíram para este trabalho, o meu sincero agradecimento.

Dedico este trabalho, com muito carinho, aos meus avós Odila, Irene e Elias

RESUMO

A castanha europeia (fruto de *Castanea sativa* Mill.) é um alimento muito nutritivo, e em Trás-os-Montes, Portugal, este fruto é amplamente produzido, consumido e comercializado. Devido as características nutricionais e de humidade, as castanhas são altamente propícias ao desenvolvimento de fungos deteriorantes, que resultam em grandes perdas na qualidade dos frutos, sendo este o principal problema pós-colheita associado à castanha armazenada. Na última década, o fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi* tem emergido preocupantemente em diversos países produtores de castanha como agente causal da podridão castanha, e atualmente é considerado um dos principais agentes fúngicos causadores de podridão. O presente estudo é pioneiro na caracterização e identificação deste agente fúngico e da respectiva doença, em Portugal e em variedades de castanha portuguesas. Este conhecimento é de maior importância e urgência para os produtores, comerciantes e indústrias do setor deste fruto, para otimizar a prevenção e o controle deste problema. Os objetivos desse trabalho foram: i) Caracterizar morfológica, ecofisiológica e molecularmente os isolados portugueses de *G. smithogilvyi*; ii) Caracterizar a doença causada por este agente e determinar a patogenicidade e a virulência deste fungo em três variedades portuguesas de castanha (Judia, Longal e Martaínha); iii) Estudar a efetividade do uso de *Trichoderma viridescens* como um agente de biocontrole contra o patógeno *G. smithogilvyi*. As variedades de castanha portuguesas não mostraram resistência ou tolerância a infeção por este fungo, entre si, sendo altamente suscetíveis quando previamente feridas e inoculadas artificialmente, com 100% de infeção e apodrecimento. Porém quando os frutos estavam sadios e bem formados, sua casca foi eficiente no combate a infeção pelo patógeno externo. Confirmou-se a existência de *G. smithogilvyi* endofítico nas castanhas portuguesas, distribuído aparentemente de forma igual entre as variedades. Verificou-se que os isolados portugueses de *G. smithogilvyi* apresentam elevada semelhança morfológica, ecofisiológica e molecular com os isolados do fungo de outros países. *G. smithogilvyi* sofreu redução de crescimento significativa nos testes de biocontrole feitos com *T. viridescens* em meio PDA, comparado aos controles sem o uso de *T. viridescens*. No entanto, esse efeito não foi significativo em meio à base de castanha, verificando-se assim uma grande adaptação do fungo ao substrato castanha, o que deixa antever que a redução ou eliminação da podridão castanha será difícil de obter.

Palavras-chave: Podridão castanha. *Gnomoniopsis smithogilvyi*. *Castanea sativa*. Biocontrole. *Trichoderma viridescens*. Fungos.

ABSTRACT

Sweet chestnut (the fruit of *Castanea sativa* Mill.) is a nutritious food of great importance in Trás-os-Montes, Portugal. Given its nutritional and water contents, chestnuts are highly prone to the development of spoilage fungi, which result in great quality losses, being this the major post-harvest problem associated with stored chestnut. In the last decade, the fungus *Gnomoniopsis smithogilvyi* has emerged in several chestnut-producing countries at worrying levels as the causal agent of brown rot, and is currently considered one of the major chestnut rot-causing agents. This study aimed at identifying and characterizing, for the first time in Portugal, this agent in Portuguese chestnut varieties. This acknowledgement is of the utmost significance for the chestnut producers, the industry and the sellers, as a first step towards the mitigation of this disease. Under this framework, the objectives of the study were: i) characterize at the morphological, ecophysiological and molecular levels the Portuguese isolates of *G. smithogilvyi*; ii) characterize the disease caused by this fungus in terms of pathogenicity and virulence in three Portuguese chestnut varieties (Judia, Longal and Martaínha); iii) study the effectiveness of *Trichoderma viridescens* as a potential biocontrol agent against *G. smithogilvyi*. The Portuguese chestnut varieties did not show any resistance or tolerance against *G. smithogilvyi*, and were highly susceptible (100% rotten) to the fungus when previously wounded and artificially inoculated. However, in apparently healthy and intact fruits, the fungus was unable to infect the fruit, showing the efficiency of the peel in retaining the disease. It was also confirmed that the fungus is present endophytically in the three chestnut varieties. In terms of the fungus characterization, it was shown that the Portuguese isolates of *G. smithogilvyi* are highly similar to the ones isolated in other countries at all studied levels. When tested against *T. viridescens*, *G. smithogilvyi* showed growth reduction in the medium PDA, but not in chestnut-based medium, which leads to the conclusion that the fungus is highly adapted to chestnut, and its reduction or elimination from the fruit will be difficult to achieve.

Keywords: Brown rot, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Castanea sativa*, Biocontrol, *Trichoderma viridescens*, Fungi.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Características dos frutos das variedades de <i>Castanea sativa</i> mais relevantes na região de Trás-os-Montes, Portugal	7
Tabela 2.2. Espécies de fungos identificadas em castanhas durante o armazenamento e respectiva percentagem em que foram isolados.....	10
Tabela 2.3. Incidência média de diferentes espécies fúngicas identificadas em castanhas a partir de diferentes condições de armazenamento (em percentagem de castanhas analisadas).....	11
Tabela 2.4. Sumário com os principais estudos que reportam o fungo <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> como agente causal de podridão castanha em frutos e em demais estruturas de <i>Castanea</i> spp.....	13
Tabela 3.1. Programa de amplificação por PCR para a região ITS e para o gene <i>TEF1-α</i>	29
Tabela 3.2. Lista de isolados de <i>G. smithogilvyi</i> e isolados “outgroup”, país de origem do isolado e número de acesso GenBank usados para a análise filogenética dos isolados portugueses	31
Tabela 4.1. Medições de conidiomata de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> em três meios de cultivo	47
Tabela 4.2. Medições de conídios de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> em três meios de cultivo	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Aspectos morfológicos das inflorescências de <i>Castanea sativa</i> . A) Feminina. B) Masculina.....	6
Figura 2.2. Sinal característico da podridão castanha causada por <i>G. smithogilvyi</i> em castanha.....	15
Figura 3.1. Fluxograma do teste de patogenicidade e virulência de <i>G. smithogilvyi</i> em <i>Castanea sativa</i>	19
Figura 3.2. Preparação das castanhas e inoculação de suspensão de esporos de <i>G. smithogilvyi</i> . A) Castanhas perfuradas na região do hilo, no eixo do embrião e no centro do fruto. B) Inoculação das castanhas no tratamento “Furada”, gotas sobre os furos. C) Inoculação das castanhas do tratamento “Inteira”. D) Inoculação nos cotilédones das castanhas sob o tratamento “Partida”	21
Figura 3.3. Fluxograma do teste para a determinação da taxa de infecção natural em <i>Castanea sativa</i>	23
Figura 3.4. Exemplo do processo de medições das conidíomata de <i>G. smithogilvyi</i> em meio de cultivo PDA incubado por 7 dias a 25 °C, usando o programa Leica Application Suite V4	25
Figura 3.5. Exemplo do processo de medições dos conídios de <i>G. smithogilvyi</i> em meio de cultivo PDA incubado por 7 dias a 25 °C, usando o programa Leica Application Suite V4.....	26
Figura 3.6. Esquema ilustrativo da comparação entre tratamentos utilizada para calcular a redução percentual de crescimento	33
Figura 4.1. Nível de Infecção Interna natural das três variedades de castanha, obtido a partir do teste de incubação controle (sem inoculação de agente fitopatogênico).....	35
Figura 4.2. Avaliação do nível de infecção fúngica das castanhas. A) castanhas sob o tratamento Partida com 7 dias de incubação. B), C) e D) castanhas sob os tratamentos Inteira com 7, 14 e 21 dias de incubação, respectivamente	36
Figura 4.3. A) Podridão por <i>Penicillium</i> spp. e <i>G. smithogilvyi</i> em castanhas submetidas ao tratamento Partida. C) e D) Alguns fungos isolados a partir das podridões internas de diferentes tratamentos, respectivamente <i>Penicillium</i> spp. e <i>G. smithogilvyi</i>	36
Figura 4.4. Castanhas sob o tratamento Inteira, após 21 dias de incubação. A) e B) Apresentando esporulações fúngicas no exterior da casca. C) Castanha cortada ao meio apresentando esporulação fúngica entre a casca e a película que envolve o endosperma	37
Figura 4.5. Nível de Infecção Interna das castanhas inoculadas com o isolado G1 de <i>G. smithogilvyi</i>	39
Figura 4.6. Nível de Infecção Interna das castanhas inoculadas com o isolado G2 de <i>G. smithogilvyi</i>	40
Figura 4.7. Castanhas sob o tratamento “Partida”, inoculadas com <i>G. smithogilvyi</i> , após 7 dias de incubação. A) Inoculadas com o isolado G1. B) Inoculadas com o isolado G2	40
Figura 4.8. Colônias de <i>G. smithogilvyi</i> reisoladas das castanhas do tratamento Partida. A) e B) Isolados G1 e G2, respectivamente	41

Figura 4.9. Crescimento micelial de <i>G. smithogilvyi</i> na região do furo e em torno das castanhas do tratamento furada (após 25 dias de incubação). A) Isolado G1. B) Isolado G2.....	41
Figura 4.10. Castanhas sob o tratamento “Furada”, inoculadas com <i>G. smithogilvyi</i> . A) Inoculadas com o isolado G1, após 15 dias de incubação. B) G2, após 15 dias de incubação. C) G1, após 25 dias de incubação. D) G2, após 25 dias de incubação .	42
Figura 4.11. Detalhe para as características distintas entre as infecções causadas por <i>G. smithogilvyi</i> quando a castanha é partida (A) ou furada (B).....	42
Figura 4.12. Castanhas sob o tratamento “Inteira”, inoculadas com <i>G. smithogilvyi</i> . A) Inoculadas com o isolado G1, após 15 dias de incubação. B) G2, após 15 dias de incubação. C) G1, após 25 dias de incubação. D) G2, após 25 dias de incubação .	43
Figura 4.13. Castanhas sob o tratamento controle, o qual não recebeu inoculação de <i>G. smithogilvyi</i> . A) Inteiras, após 25 dias de incubação. B) Furadas, após 25 dias de incubação. C) Partidas, após 25 dias de incubação	43
Figura 4.14. Colônias de dois isolado de <i>G. smithogilvyi</i> após 10 dias de incubação a 25 °C. A) e B) isolado G1 em meio de cultivo PDA. Visão superior e do verso das placas, respectivamente. C) isolado G1 em meio de cultivo MC. D) e E) isolado G2 em meio de cultivo PDA. Visão superior e do verso das placas, respectivamente. F) isolado G2 em meio de cultivo MC	44
Figura 4.15. Morfologia de <i>G. smithogilvyi</i> , em meio PDA após 7 dias de incubação a 25 °C. A) Detalhe do centro da colônia rico em conidiomata. B) Detalhe de conidiomata. C) Estrutura micelial com conidiomata. D) Visão ao microscópio óptico de conidiomata rompida. Coloração artificial preparada com azul de algodão.....	45
Figura 4.16. Morfologia de <i>G. smithogilvyi</i> , em meio PDA após 7 dias de incubação a 25 °C. A) Visão ao microscópio óptico dos micélios. B) Detalhe para os esporos (conídios) ao microscópio óptico.....	47
Figura 4.17. Crescimento de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em 5 temperaturas (12, 20, 25, 30 e 35 °C) em meio PDA, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa (lado esquerdo) e perspectiva inferior (lado direito)	49
Figura 4.18. Crescimento de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em 4 temperaturas (12, 20, 25 e 30 °C) em meio MEA, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa (lado esquerdo) e perspectiva inferior (lado direito)	49
Figura 4.19. Crescimento de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em 5 temperaturas (12, 20, 25, 30 e 35 °C) em MC, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa	50
Figura 4.20. Duração da fase <i>Lag</i> em dias, da média das medições de três estirpes de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidas a diferentes temperaturas de incubação.....	52
Figura 4.21. Taxa de crescimento diária (cm/dia) de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidos a diferentes temperaturas de incubação (5, 12, 20, 25, 30 e 35 °C)	53
Figura 4.22. Média da contagem de esporos das três estirpes de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidas a 5 temperaturas de incubação.....	54

Figura 4.23. Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (três extrações de DNA para o isolado G1 e duas para G2 e G3, com diferentes qualidades)	56
Figura 4.24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de três isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (G1, G2 e G3). M: marcador de peso molecular (100 bp ladder); B: controlo negativo da PCR	56
Figura 4.25. Análise evolutiva de <i>G. smithogilvyi</i> pelo método de máxima verossimilhança. A) Árvore filogenética para a região ITS. Esta análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos, com um total de 513 posições no conjunto de dados final. B) Árvore filogenética para o gene <i>TEF1-α</i>	57
Figura 4.26. Teste de co-cultura em meio PDA, com 4 dias de incubação a 25 °C. Vista superior (direita) e inferior (esquerda) das colônias. G1 e G2: isolados de <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> ; T1 e T2: isolados de <i>Trichoderma viridescens</i>	58
Figura 4.27. Teste de co-cultura em meio de castanha, com 4 dias de incubação a 25 °C. G1 e G2: isolados de <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> ; T1 e T2: isolados de <i>Trichoderma viridescens</i>	59
Figura 4.28. Crescimento longitudinal (diâmetro, em cm) dos isolados <i>G. smithogilvyi</i> (G1 e G2), quando confrontados consigo próprio (G1-G1 e G2-G2) e com <i>T. viridescens</i> (G1-T1, G1-T2, G2-T1, G2-T2). Superior direito: G1 em PDA; superior esquerdo: G2 em PDA; Inferior direito: G1 em MC; inferior esquerdo: G2 em MC.....	57
Figura 4.29. Crescimento transversal (diâmetro, em cm) dos isolados <i>G. smithogilvyi</i> (G1 e G2), quando confrontados consigo próprio (G1-G1 e G2-G2) e com <i>T. viridescens</i> (G1-T1, G1-T2, G2-T1, G2-T2). Superior direito: G1 em PDA; superior esquerdo: G2 em PDA; Inferior direito: G1 em MC; inferior esquerdo: G2 em MC.....	58
Figura 4.30. Redução de crescimento das medições longitudinais (D1) e transversais (D2), relativos aos dois isolados de <i>G. smithogilvyi</i> (superiores), aos dois isolados de <i>T. viridescens</i> (medianos) e aos dois meios de cultura (inferiores).....	61
Figura 4.31. Teste de confronto entre <i>T. viridescens</i> e <i>G. smithogilvyi</i> após 24 horas de incubação.....	63
Figura 4.32. Diferenças morfológicas de <i>G. smithogilvyi</i> em MC (superiores) e em meio PDA (inferiores). Placas com 6 dias de incubação	63
Figura 4.33. Teste co-cultura em MC e em meio PDA, após 6 dias de incubação	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO

Os frutos do castanheiro (*Castanea sativa* Miller) desempenham um papel muito importante na alimentação humana em virtude da sua composição nutricional e seus efeitos potencialmente benéficos para a saúde (Gonçalves *et al.*, 2010).

Em Portugal, as castanhas representam uma relevante contribuição para a balança econômica, sobretudo em Trás-os-Montes, localizado no Nordeste do país. Esta região compreende 89% da área nacional dedicada ao cultivo do castanheiro e é responsável por 88% da produção nacional do fruto (INE, 2018). As castanhas produzidas nesta região são de alta qualidade, sendo reconhecidas pela União Europeia com a Denominação de Origem Protegida (DOP) "Castanha da Terra Fria" (CE, 1996).

Todas as características nutricionais da castanha, somadas ao elevado teor de água, tornam este fruto um substrato muito propício ao desenvolvimento e proliferação de um amplo espectro de fungos deteriorantes, o que é um grande problema enfrentado por toda a cadeia produtora deste fruto, pois as castanhas acometidas por alguns destes agentes fúngicos podem perder completamente a qualidade e consequentemente seu valor comercial. As podridões são um problema maioritariamente enfrentado durante os processos de pós-colheita e armazenamento, onde as condições de temperatura e umidade são mais favoráveis ao crescimento dos fungos.

Desde meados dos anos 2000, um aumento acentuado na incidência de castanhas podres tem sido amplamente observado por produtores de castanhas em algumas regiões da Europa e Australásia, sendo posteriormente *Gnomoniopsis smithogilvyi* o agente fúngico associado a estes apodrecimentos (Visentin *et al.*, 2012). Até a presente data, *G. smithogilvyi* é considerado o principal agente da podridão da castanha em vastas áreas geográficas que abrangem três continentes (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012; Dar & Rai, 2015; Lione *et al.*, 2019). Sendo assim, *G. smithogilvyi* pode ser considerado atualmente como um sério fitopatógeno emergente ameaçando o cultivo da castanha e desafiando pesquisadores, legisladores e produtores deste fruto em uma escala global.

1.2 OBJETIVOS

Neste trabalho pretendeu-se:

- i) Caracterizar morfológica, ecofisiológica e molecularmente os isolados portugueses do agente causal da podridão castanha, *G. smithogilvyi*, os quais foram previamente isolados de castanhas provenientes de Trás-os-Montes, Portugal;
- ii) Caracterizar a doença causada por este agente fúngico, em três variedades portuguesas de castanha (Judia, Longal e Martaínha), e determinar a patogenicidade e a virulência deste fungo nas mesmas três variedades de castanha;
- iii) Obter conhecimento sobre os isolados portugueses de *G. smithogilvyi*, possibilitando o futuro desenvolvimento de estratégias de redução de incidência deste fungo, e perdas de rendimento associadas as castanhas contaminadas.
- iv) Estudar a viabilidade/efetividade do uso de *Trichoderma viridescens* como um agente de biocontrole contra o patógeno *G. smithogilvyi*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CASTANHA – ENQUADRAMENTO GLOBAL

O gênero *Castanea*, família Fagaceae, compreende 12 espécies de castanheiros em diferentes regiões do mundo, dos quais quatro representam importância econômica principal: *Castanea crenata* Siebold & Zucc. e *Castanea mollissima* Blume, ambas predominantemente presentes na Ásia, produtoras da castanha japonesa e chinesa; *Castanea dentata* (Marsh.) Borkausen, encontrada na América do Norte e conhecida como castanha americana; e *Castanea sativa* Miller, a castanha europeia, também chamada de castanha portuguesa e distribuída desde a Ásia Menor a Europa Meridional (Serrano *et al.*, 2001).

Os castanheiros têm sido desde longa data um recurso valioso para as populações que habitam muitas áreas da Ásia, Sul da Europa, Norte da África e países próximos da bacia do Mar Mediterrâneo. Os frutos comestíveis dos castanheiros eram a base da alimentação e a madeira de excelente qualidade fornecia o material para a construção e lenha. Nos dias atuais, as castanhas não são mais uma fonte de subsistência, todavia, os castanheiros permanecem desempenhando um papel importante em estratégias de alimentação; em muitos sistemas agroflorestais, como os que conciliam a produção de cogumelos, por exemplo (Terrón, 2010); no potencial paisagístico; enquanto patrimônio histórico-cultural; e também na balança econômica dos países produtores (Bounous, 2001). Além disso, as florestas de castanheiros naturais contribuem na manutenção de ecossistemas complexos e biodiversos, visto que são muitos os vertebrados que as procuram, a exemplo do coelho (*Oryctolagus cuniculus*), o javali (*Sus scrofa*), pequenos mamíferos e os cervídeos, entre outros.

Entre as castanhas, a europeia destaca-se em virtude de sua interessante composição nutricional, sendo uma das mais produzidas e consumidas. Os frutos apresentam elevados teores de água (mais de 50% do peso) e são ricos principalmente em carboidratos (aproximadamente 40%), a exemplo do açúcar e do amido. Também são fontes de aminoácidos essenciais, fibras, e macro e micro elementos (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, zinco e etc). Contêm baixa quantidade de proteínas (2 a 4%) e de lipídeos (1,5 a 5%) (Barreira *et al.*, 2009). Além disso, são fonte de antioxidantes,

vitaminas E e C, e compostos fenólicos (gálico e ácido elágico), os quais são benéficos para a saúde (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Castanea sativa constitui características adaptadas ao clima temperado marítimo, com invernos e verões pouco rigorosos, como no Noroeste de Portugal. Entretanto, as florestas em que os castanheiros vegetavam espontaneamente nesta região sofreram degradação humana ao longo dos séculos, e gradativamente os castanhais foram sendo empurrados para zonas interiores e montanhosas do Nordeste do país. Hoje, os souts e castinçais (exploração frutícola ou madeireira, respectivamente) desempenham um papel crucial para a sobrevivência das comunidades de agricultores nortenhos (Laranjo *et al.*, 2007).

Atualmente, a produção mundial de castanhas aproxima-se de 2,4 milhões de toneladas/ano (considerando as quatro espécies principais). A China é a maior produtora mundial, com mais de 1,9 milhões de toneladas/ano. Na Europa, a Itália apresenta-se em primeiro lugar, com 53,3 mil toneladas/ano, enquanto Portugal é o terceiro maior produtor, com 34,1 mil toneladas/ano, seguido da Espanha, com cerca de 15 mil toneladas/ano (FAO, 2018). O mercado mundial da castanha movimentou em 2018 mais de US\$ 800 milhões. Na Europa, a quantia ultrapassou US\$ 380 milhões, dos quais US\$ 112 milhões foram gerados por Portugal (FAO, 2018).

2.1.1 Castanha em Portugal

Em Portugal, as zonas produtoras da castanha europeia distribuem-se pela região central e sobretudo região norte do país, especificamente nas Denominações de Origem Protegida (DOP) Terra Fria, Padrela e Soutos da Lapa. A criação das DOP's teve como principais objetivos a preservação e valorização do património genético do castanheiro, fixando métodos que mantenham os parâmetros diferenciadores na produção, nas diferentes regiões, e regras de mercado. A área geográfica da DOP Castanha da Terra Fria abrange freguesias dos concelhos de Alfandega da Fé, Bragança, Chaves, Macedo de Cavaleiros, Mirandela, Valpaços, Vimioso e Vinhais. A DOP Castanha da Padrela compreende as freguesias dos conselhos de Chaves, Murça e Vila Pouca de Aguiar. A Castanha dos Soutos da Lapa tem a produção limitada a freguesias dos concelhos de Aguiar da Beira, Armamar, Lamego, Moimenta da Beira, Penedono, São João da Pesqueira, Sernancelhe, Tabuaço, Tarouca e Trancoso (Borges *et al.*, 2007). A atividade

é fundamental para o desenvolvimento do interior e contribui fortemente na movimentação econômica destes territórios (Bragança *et al.*, 2009).

A região de Trás-os-Montes compreende 89% da área nacional dedicada ao cultivo do castanheiro e é responsável por 88% da produção nacional do fruto. As principais zonas produtoras (Alto Tâmega e Terra Fria Transmontana) colheram 34,1 mil toneladas do fruto no ano de 2018, 14,2% acima do alcançado na campanha anterior e em linha com os resultados dos últimos 5 anos (INE, 2018). Em relação aos preços anuais pagos aos produtores de castanhas, houve um aumento de 50,2% no valor pago para cada 100 Kg do fruto, entre os anos 2016 e 2018, passando de 185,36 € para 278,35 € (INE, 2018).

Entre os frutos portugueses de casca rija (amêndoas, avelãs e nozes), a castanha ocupa o maior significado na balança de importação/exportação do país. Em 2018, a exportação do fruto contribuiu com mais de 82% do saldo nesta categoria (INE, 2018). Não existem estatísticas conhecidas para o processamento da castanha, mas sabe-se que a maioria é exportada previamente processada (Rodrigues, 2010).

As castanhas também estão fortemente ligadas à cultura portuguesa, tendo em vista a diversidade de usos culinários em que é empregada, as tradicionais celebrações do Magusto que decorrem em todo o país e as numerosas feiras e festas para comemorar o fim das colheitas e que proporcionam alegres momentos de convívio, nos quais comem-se as castanhas assadas em fogueiras, bebe-se vinho, canta-se e vive-se a tradição (Laranjo *et al.*, 2007). As árvores imponentes e longevas, muitas centenárias, completam este cenário, e afirmam o inegável valor patrimonial desta espécie.

2.2 BIOLOGIA DO CASTANHEIRO EUROPEU

O castanheiro é uma espécie arbórea angiospérmica dicotiledônea, pertencente a ordem Fagales, família Fagaceae, gênero *Castanea* e espécie *Castanea sativa* Miller. As árvores são caracterizadas por um notável vigor e dimensão das suas copas. Bastante robustas, atingem em média de 15 a 20 metros de altura, podendo superar os 30 metros de altura, e entre 6 e 10 metros de diâmetro, também podem alcançar os incríveis 1500 anos de idade. O sistema radicular é apumado, porém com limitado desenvolvimento em profundidade. As folhas são simples, alternas, com nervuras regulares, bordas serradas e

caducas. É uma planta monoica com flores díclinas, as inflorescências masculinas e femininas apresentam-se em amentos ou amentilhos, inseridos na parte terminal dos ramos do ano (Figura 2.1). A floração decorre nos meses de Maio e Julho e a polinização é majoritariamente entomófila (coleópteros e himenópteros), mas também anemófila, com fecundação cruzada. A maturação é bastante precoce, ocorrendo entre finais de Setembro e início de Outubro. As sementes apresentam germinação hipógea (Laranjo *et al.*, 2007, 2009; Baltazar, 2015).



Figura 2.1. Aspectos morfológicos das inflorescências de *C. sativa*. A) Feminina. B) Masculina. **Fonte:** A: (<http://www.flora-on.pt/#/hje4s>) B: (<http://www.flora-on.pt/#/hlAOy>)

2.2.1 Variedades de Castanheiro Europeu em Trás-os-Montes

O castanheiro é caracterizado por uma ampla variabilidade genética, resultado da fecundação cruzada, com numerosos ecotipos espalhados por Portugal, particularmente em Trás-os-Montes. Ao todo, as três DOP's da província somam 13 variedades registradas, nomeadamente, Amarelal, Aveleira, Boa Ventura, Côta, Judia, Lada, Lamela, Longal, Martaínha, Negra, Negral, Preta e Trigueira. Na DOP Terra Fria mais de 70% da produção corresponde a variedade Longal, os 30% restantes correspondem as demais variedades (Matos, 2003; Laranjo *et al.*, 2007). Em relação as Castanhas dos Soutos da Lapa, só são registradas as variedades Longal e Martaínha para esta DOP, portanto, são estas as representantes de maior significado. Enquanto para a DOP Padrela, destacam-se as variedades Judia e também Longal (Laranjo *et al.*, 2007).

De acordo com Matos (2003), a forma (feitio) da castanha é um parâmetro condicionante para o escoamento da produção. As indústrias europeias procuram as variedades que satisfaçam os parâmetros exigidos e que melhor se adequam a confecção do produto final. Segundo a autora, se o cliente pretende uma castanha redonda para a indústria, solicita em primeiro lugar a Martaínha, depois a Judia, em seguida a Longal, e por fim a Negral. As indústrias também valorizam a facilidade de descasque e pela, e a menor ocorrência de polispermia das castanhas, características que colocam as variedades Martaínha e Longal em destaque. Para o mercado de castanha em fresco as de maior calibre são as mais valorizadas, portanto, Judia, Martaínha e Lada representam as variedades de maior preferência neste sentido. Na Tabela 2.1 são apresentadas algumas características das três variedades mais relevantes de castanhas em Trás-os-Montes.

Tabela 2.1. Características dos frutos das variedades de *Castanea sativa* mais relevantes na região de Trás-os-Montes, Portugal.

Características	Judia	Longal	Martaínha
Forma	Elipsoide transversa a globosa	Elíptica alongada e ovoide	Globosa
Calibre	Grande a muito grande	Médio a grande	Médio a grande
Nº de frutos/Kg	59	77	82
Maturação	Semi-tardia	Tardia	Semi-precoces
Cor e brilho	Vermelha e brilhante	Castanha e brilhante	Castanha clara com brilho médio
Cor da polpa	Creme	Creme	Creme
Polispermia (%)	8	1	4
Compartimentação	Elevada	Muito reduzida	Muito reduzida
Penetrações	Elevadas e profundas	Reduzida	Reduzidas a aceitáveis
Rachado	Reduzido	Raro	Reduzido
Conservação natural	Média a boa	Muito boa	Muito boa
Facilidade ao descasque	Média	Muito boa	Boa a muito boa
Sabor	Médio	Excelente	Muito bom
Utilização preferencial	Fresco	Fresco e industrial	Fresco e industrial

Fonte: Matos, 2003; Borges *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008

2.3 PRODUÇÃO DA CASTANHA – FATORES QUE INTERFEREM NA QUALIDADE

A qualidade das castanhas pode ser influenciada por diversos fatores durante a produção, destacando-se os aspectos genéticos relacionados com as características das

variedades produzidas em cada região, os diferentes métodos de cultivo implementados nos sotos e as circunstâncias ambientais durante a maturação dos frutos (Cuamba, 2020). Condições abióticas desfavoráveis, como por exemplo a baixa fertilidade dos solos, assim como, temperaturas elevadas e o estresse hídrico durante o período, também influenciam negativamente a qualidade das safras, gerando frutos malformados, por vezes rachados, e por consequência mais propícios ao ataque de pragas e patógenos causadores de podridões (Álvarez, 2010).

No momento da colheita, a qualidade das castanhas também pode ser afetada em diferentes níveis pelo aparecimento de fungos. Existem muitos métodos para se conduzir a colheita: colheita manual, varredura, vácuo, ou uma combinação destes, e a escolha dependerá, por exemplo, da capacidade de investimento, qualidade desejada, objetivo, produtividade, tamanho do soto, e a localização e declive do soto (topografia) (Sieber *et al.*, 2007). Em Portugal, especificamente no nordeste transmontano, os frutos são tradicionalmente colhidos a mão diretamente do chão, em sacos de 50 Kg. Quando todas as castanhas já estiverem caídas das árvores, a coleta é feita mecanicamente com uma máquina de sucção (Rodrigues, 2010), de modo que folhas, resíduos e demais sujeiras (que são inóculos de fungos habitantes do solo) também são transportadas temporariamente para o depósito e ficam em contato com as castanhas. O desenvolvimento de fungos no armazém é consequência da humidade excessiva e das temperaturas elevadas devido à falta de ventilação. As primeiras castanhas a serem atacadas são aquelas que apresentam malformações, passando posteriormente as infecções para as outras castanhas (Álvarez, 2010).

2.3.1 Pragas

As pragas associadas ao castanheiro assumem importância elevada. O principal problema enfrentado em Trás-os-Montes é o bichado da castanha, provocado pelo complexo de pragas *Laspeyresia* (syn. *Cydia*) *splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* Zel. e *Pammene fasciana* L., tendo em vista que os níveis populacionais destas espécies são consideráveis na região, seguido pelo gorgulho da castanha, *Curculio* (syn. *Balaninus*) *elephas* Gyll. Em ambos os casos, os insetos depreciam o valor comercial do fruto e causam perdas no rendimento aos agricultores e também aos comerciantes. De fato, 80% dos estragos nos frutos são causados originalmente por estas pragas (Bento *et*

al., 2005; 2007). Outro problema é que ao serem acometidas por estas pragas ou outras, as castanhas se tornam ainda mais suscetíveis a infecções fúngicas por consequência dos furos na casca externa provocados pelos insetos (1 a 2 mm de diâmetro), que são uma porta de entrada aos patógenos, facilitando o acesso ao endosperma, onde se desenvolvem com facilidade (Wells & Payne, 1980).

2.3.2 Podridões

Uma das principais dificuldades dentro da cadeia produtiva da castanha em Portugal é a depreciação da qualidade dos frutos causada por podridões. Castanhas são frutos muito atrativos e propícios ao ataque e desenvolvimento de fungos patogênicos, por apresentarem elevado nível de açúcares e alta atividade de água (Driss, 2019). A infecção por fungos pode causar sérios danos ao endosperma, por vezes deteriorando completamente o interior do fruto e consequentemente inviabilizando sua comercialização.

As infecções internas nas castanhas podem ter início ainda em pré-colheita (Jermini *et al.*, 2006), durante o desenvolvimento dos frutos na árvore, pois alguns fungos apresentam comportamento endofítico, ou seja, vivem no interior do castanheiro sem provocarem sintomas na planta, mas no momento em que os frutos amadurecem e caem, e as condições são adequadas, a doença se desenvolve (Dennert *et al.*, 2015). Como exemplo estão os agentes causadores da podridão castanha: *Phomopsis castanea* Sacc; *Phoma castanea* Peck e *Phoma endogena* (Speg.) Cif. (Conedera *et al.*, 2004; Donis-González, 2008; LIONE *et al.*, 2019). Os autores Vettraino *et al.* (2005) também descrevem *Sclerotinia pseudotuberosa* Rehm (syn. *Ciboria batschiana* Zopf., *Sclerotinia batschiana*; anamorfo de *Rhacodiella castanea* (syn. *Myrioconium castanea*)), causadora da podridão negra, como um agente endofítico. Os mesmos autores relatam estes quatro fungos como sendo os principais e mais severos agentes depreciadores da castanha.

Contudo, na fase de campo a maioria das infecções das castanhas por microrganismos de deterioração ocorre no período que antecede a colheita, entre a queda dos ouriços no chão e a apanha. Durante este intervalo, os frutos são rapidamente contaminados por ficarem expostos a um grande número de inóculos de patógenos presentes no solo, e a humidade elevada. Quando a coleta dos frutos decorre em períodos chuvosos, cerca de 30% da safra pode ser comprometida (Moscetti *et al.*, 2014). Outro

fator determinante é o tempo em que as castanhas permanecem em contato com o solo até o momento de serem recolhidas, verificando-se uma proporção direta entre a quantidade de dias de espera e o surgimento de infecções (Sieber *et al.*, 2007).

De acordo com Wells & Payne (1975) e Rodrigues *et al.* (2013), algumas espécies de fungos são consideradas habitantes naturais da superfície da casca das castanhas, como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Alternaria* spp., os quais podem ser associados com frequência aos frutos, mas não necessariamente como causadores de dano interno. Sabe-se que uma grande diversidade de fungos pode vir a contaminar as castanhas. Lione *et al.* (2019) citam, por exemplo, *Acrospeira mirabilis* Berk. & Broome, *Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst., *Cryptodiaporthe Castanea* (Tul. & C. Tul.) Wehm. Buchw., *Cytodiplospora castanea* Oudem., *Discula campestris* (Pass.) Arx, *Dothiorella* spp., *Mucor* spp., *Neofusicoccum ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Pestalotia* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Trichoderma* spp. e *Truncatella* spp., embora estes não representem significativa importância econômica para a cultura.

As podridões de pós-colheita e durante o armazenamento têm particular relevância (Jermini *et al.*, 2006; Sieber *et al.*, 2007). Isto se dá em razão das condições específicas de temperatura e humidade que se estabelecem em alguns destes ambientes e que são bastante propícias ao crescimento e proliferação dos fungos. Os mesmo autores citam *C. batschiana*, *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Phomopsis viterbensis* Camici, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Trichothecium* spp., *Botrytis cinerea* Pers., *Fusicoccum* spp., *Phoma* spp. e *Gibberella* spp., como alguns dos agentes que podem ser favorecidos nas condições de armazenamento.

Destaca-se, também, que as contaminações das castanhas por patógenos em pré-colheita e/ou durante o armazenamento podem provocar, para além das perdas econômicas substanciais aos produtores, processadores e distribuidores, um potencial risco aos consumidores, em consequência do desenvolvimento de algumas micotoxinas, que nas castanhas estão associadas principalmente aos fungos dos gêneros *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., as quais são malélicas a saúde humana (Rodrigues, 2010), reforçando a importância em reduzir a ocorrência de infecções nos frutos. Na Tabela 2.2, são apresentadas as percentagens de isolamento de alguns fungos, a partir de castanhas armazenadas em Portugal.

Tabela 2.2. Espécies de fungos identificadas em castanhas durante o armazenamento e respectiva percentagem em que foram isolados

Espécies identificadas	Percentagem (%) de isolados
<i>Botrytis cinerea</i>	15
<i>Coniella fragariae</i>	0,7
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	9,3
<i>Mucor racemosus</i>	1,4
<i>Penicillium</i> spp.	17,1
<i>Rizhopus</i> spp.	42,1
Outros fungos	13,7

Fonte: Coelho & Gouveia (2017)

Sob outra perspectiva, Driss (2019) isolou e identificou os fungos e quantificou a frequência de sua incidência em castanhas submetidas a diferentes condições de armazenamento, também em Portugal, conforme trazido na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Incidência média de diferentes espécies fúngicas identificadas em castanhas a partir de diferentes condições de armazenamento (em percentagem de castanhas analisadas)

Espécies identificadas	Incidência (%)
<i>Alternaria alstroemeria</i>	5,1
<i>Botrytis cinerea</i>	10,5
<i>Ciboria americana</i>	9,5
<i>Ciboria batschiana</i>	10,5
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	6,8
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i>	24
<i>Penicillium brevicompactum</i>	17,5
<i>Penicillium polanicum</i>	9,5
<i>Penicillium thomii</i>	13,7
<i>Phacidium mollerianum</i>	9,2
<i>Rutstroemia echinophila</i>	8,7
<i>Trichoderma viridescens</i>	8

Fonte: Driss (2019)

2.4 PODRIDÃO CASTANHA – *Gnomoniopsis smithogilvyi*

Nas últimas décadas, um aumento acentuado na incidência de castanhas apresentando podridões com sintomas atípicos aos sintomas de doenças que normalmente acometem os frutos vem sendo observada por produtores na Austrália, Nova Zelândia, Ásia, e em algumas regiões da Europa, como Itália, França, Espanha, e recentemente

Portugal (Smith & Agri, 2008; Smith & Ogilvy, 2008; Gentile *et al.*, 2009; Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012). Inicialmente, a doença havia sido associada a *Gnomonia pascoe* sp. nov. (GENTILE *et al.*, 2010), no entanto em 2012, por meio de análises moleculares, o agente causal dos apodrecimentos foi atribuído a *Gnomoniopsis smithogilvyi* L.A. Shuttlew., E.C.Y. Liew & D.I. Guest (2012) (syn. *Gnomoniopsis castaneae* G. Tamietti 2012), descrito como uma nova espécie fúngica fitopatogênica.

Desde então, houve alguma discordância entre a comunidade científica com relação a nomenclatura mais adequada a se designar o patógeno em questão. No ano de 2018, Shuttleworth publicou uma correspondência discutindo e esclarecendo o nome do agente causal da podridão castanha (Shuttelworth, 2018). O autor considerou que *G. smithogilvyi* e *G. castaneae* são o mesmo fungo, e que o nome correto do principal agente causador da podridão da castanha na Austrália, Nova Zelândia e Europa seria *G. smithogilvyi*, sendo esta a nomenclatura formal encontrada no buscador internacional Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>).

Atualmente, *G. smithogilvyi* é considerado o principal fungo emergente causador de podridão em castanhas em uma vasta área geográfica que abrange três continentes. Na Itália, Visentin *et al.* (2012) relatam um aumento na frequência de isolamento deste fungo em castanhas de $29,2 \pm 22,7\%$ em 2008 e $35 \pm 21,2\%$ em 2009 para $74,6 \pm 9,4\%$ em 2011. Também na Itália, Maresi *et al.* (2013) indicam níveis de incidência de 49%. Na Austrália no ano de 2013 e na Suíça em 2015, foram reportados picos de 72 e 91%, respectivamente (Shuttleworth *et al.*, 2013; Dennert *et al.*, 2015). Em Portugal, o primeiro relato de isolamento de *G. smithogilvyi* foi em 2017 por Coelho & Gouveia (2017), e mais recentemente por Driss (2019) em 2019. Isto posto, reconhece-se a seriedade e a importância deste fitopatógeno que vem ameaçando o cultivo da castanha e a produtividade.

A origem de *G. smithogilvyi* ainda é desconhecida e existem diferentes propostas que buscam explicar a disseminação atual e a possível propagação intra e intercontinental (Pasche *et al.*, 2016a; Seddaiu *et al.*, 2017). Na Tabela 2.4 são apontadas as principais referências a reportarem este agente como causador da podridão castanha no gênero *Castanea*.

Tabela 2.4. Sumário com os principais estudos que reportam o fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi* como o agente causal de podridão castanha em frutos e em demais estruturas de *Castanea* spp.

Hospedeiro	Sintomas	Nível trófico	País	Referência
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	Austrália	Smith & Agri (2008)
<i>Castanea</i> spp.	Podridão das castanhas	Patogênico	Austrália	Smith & Ogilvyi (2008)
<i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	Nova Zelândia	Smith & Agri (2008)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas; assintomático nas flores e estames	Patogênico e endofítico	Itália	Gentile <i>et al.</i> (2009)
<i>Castanea</i> spp.	Sintomas de infestação em galhos (inoculação artificial)	Patogênico	Itália	Magro <i>et al.</i> (2010)
<i>Castanea</i> spp.	Podridão das castanhas; assintomático nos ouriços mortos	Patogênico e saprófita	Austrália	Shuttleworth <i>et al.</i> (2012)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas; assintomático nas cascas e flores	Patogênico e endofítico	Itália	Visentin <i>et al.</i> (2012)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas; assintomático nas cascas e brotos	Patogênico e endofítico	Itália	Maresi <i>et al.</i> (2013)
<i>C. sativa</i>	Cancro em brotos e galhos	Patogênico	Índia	Dar & Rai (2015)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas; assintomático em castanhas maduras	Patogênico e endofítico	Suíça	Dennert <i>et al.</i> (2015)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	França	Lione <i>et al.</i> (2015)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas; cancro em ramos	Patogênico	Eslovênia	EPPO (2017)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	Portugal	Coelho & Gouveia (2017)
<i>C. sativa</i>	Cancro em brotos	Patogênico	Reino Unido	Lewis <i>et al.</i> (2017)
<i>C. sativa</i> e <i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i>	Podridão das castanhas; assintomático em flores, ouriços e brotos	Patogênico e endofítico	Austrália	Shuttleworth & Guest (2017)
<i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i>	Cancro nos ramos	Patogênico	Espanha	Trapiello <i>et al.</i> (2017)
<i>C. sativa</i>	Cancro na casca	Patogênico	Bélgica	Chandelier <i>et al.</i> (2018)
<i>C. sativa</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	Portugal	Driss (2019)
<i>C. mollissima</i> e <i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i>	Podridão das castanhas	Patogênico	EUA	Sakalidis <i>et al.</i> (2019)

2.4.1 Biologia e Ecologia do Patógeno

Gnomoniopsis smithogilvyi é um fungo ascomiceto pertencente a ordem Diaporthales e família Gnomoniaceae. Este patógeno coloniza diferentes tecidos de hospedeiros arbóreos e arbustivos, que incluem espécies cultivadas e silvestres pertencentes as famílias Betulaceae, Oleaceae, Pinaceae e Fagaceae. Este fungo é conhecido na fase teleomórfica e também anamórfica, produzindo ascomata (peritécios) e conidiomata (acérvulos), respectivamente (Visentin *et al.*, 2012). Ambas as fases foram observadas e descritas em castanhas (*C. sativa*, *C. crenata*, e híbridos entre as duas espécies) (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012; Pasche *et al.*, 2016a).

Este patógeno causa podridões em frutos, brotos, ramos, folhas e flores dos respectivos hospedeiros. Este fungo também é referido como um dos principais endófitos do castanheiro, podendo estar presente de forma assintomática em todas as estruturas vegetais mencionadas anteriormente (Dar & Rai, 2015). Ademais, *G. smithogilvyi* exibe a capacidade de sobreviver saprofiticamente nos resíduos da castanha, sobretudo nos ouriços caídos no chão do soto, os quais representam o principal substrato para a formação de peritécios e a liberação subsequente de ascósporos infecciosos (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012; Dar & Rai, 2015).

Gnomoniopsis smithogilvyi demonstra efetuar reprodução predominantemente por via sexual, uma vez que foi identificada uma alta diferenciação genética nestes indivíduos, por meio de estudos genéticos populacionais na Itália, França e Suíça (Sillo *et al.*, 2017). Sendo assim, este patógeno pode vir a representar um alto risco em nível global, pois é provável que seja dotado de um elevado potencial evolutivo fomentado pela reprodução sexual prevalecente (Lione *et al.*, 2019). A propagação clonal através da disseminação de conídios também pode ser relevante. O vento, insetos, e a chuva, desempenham um papel importante como portadores e dispersores de inóculo infeccioso, como ascósporos e conídios (Shuttleworth & Guest, 2017).

2.4.2 Sintomologia e Diagnose da Doença

Nos frutos do castanheiro, principalmente nos estágios pós-colheita, *G. smithogilvyi* provoca podridões que caracterizam-se pela coloração acastanhada, de tonalidade pálida, intermediária ou escura, no endosperma e no embrião (Figura 2.2),

acompanhada de alterações na textura do fruto, por vezes tenro e noutras desidratado. As lesões ocorrem como manchas ou como uma margem clara na extremidade do hilo, no eixo do embrião ou uma combinação destes. Dependendo da progressão da doença, os sintomas podem ser muito semelhantes aos provocados por outros agentes causais, como *P. endogena*, por exemplo. No entanto, os sinais de apodrecimento que indicam a infeção só são visíveis ao expor o endosperma. Outro agravante é a subestimação na avaliação da incidência do fungo em castanhas assintomáticas, quando o diagnóstico se baseia apenas na inspeção visual e não no isolamento (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012).

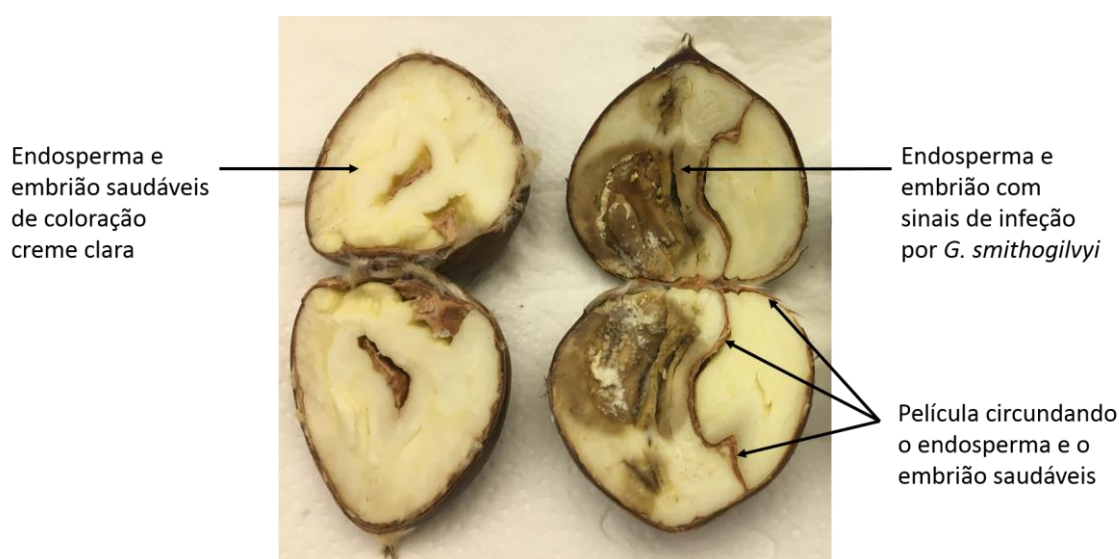


Figura 2.2. Sinal característico da podridão castanha causada por *G. smithogilvyi* em castanha.

O fungo também pode ocasionar cancro na casca e necrose nas folhas e flores do castanheiro. Os cancros, quando acometem mudas e ramos jovens, apresentam morfologia semelhante aos ocasionados por *Cryphonectria parasítica* (Murrill) ME Barr (Pasche *et al.*, 2016a), dificultando a identificação.

Independentemente do tipo da doença, o método de diagnose para *G. smithogilvyi* mais confiável é feito a partir das amostras vindas do campo, e subsequente isolamento dos microrganismos associados aos sinais da infeção em substrato *Malt Extract Agar* (MEA), *Malt Yeast Agar* (MYA) ou *Potato Dextrose Agar* (PDA), seguido da identificação dos parâmetros morfométricos de peritécios e ascósporos ou acérvulos e conídios, e/ou ensaios moleculares por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em conjunto de análise filogenética com base nos conjuntos de primers específicos ITS, TEF1- α e β -tubulina (Shuttleworth *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012).

2.5 MÉTODOS DE CONTROLE DE PODRIDÕES

São vários os métodos possíveis que buscam manter a qualidade e promover a preservação das castanhas. Primeiramente, deve-se prevenir que as mesmas sejam infetadas no campo, por meio do manejo integrado de pragas, por exemplo, identificando e controlando os insetos depreciadores do fruto, e que consequentemente contribuem para o aumento da suscetibilidade das castanhas a contaminação fúngica.

Durante o armazenamento, as castanhas podem passar por alguns processos e tratamentos, tais como: i) banho de água corrente, que permite a separação por flutuação e a eliminação dos frutos deformados e podres (Conedera *et al.*, 2005), ii) imersão em água quente, bastante eficiente na eliminação de pragas internas (Conedera *et al.*, 2005), iii) aplicação de Ozônio (O₃), que promove a prevenção do desenvolvimento microbiano e a inibição da deterioração por fungos (Oztekin *et al.*, 2006), iv) utilização do hipoclorito de sódio como desinfetante superficial, designado apenas para algumas aplicações específicas, v) aquecimento por rádio frequência, que eleva a temperatura interna da castanha rapidamente, sendo menos danoso às características nutricionais do fruto, quando comparado a outros tratamentos de aquecimento lento (Hou *et al.*, 2018), vi) armazenamento em atmosfera controlada, especificamente sob quantidade de oxigênio ultrabaixo associado a refrigeração.

2.5.1 Controle de *G. smithogilvyi*

Ainda em pré-colheita, a eliminação dos ouriços caídos no chão do soto pode promover a minimização da pressão de inóculo de *G. smithogilvyi* no campo, já que é nesse resíduo que o estágio teleomórfico do fungo se desenvolve e prolifera com facilidade pela via sexual. Entretanto, esta prática acaba não sendo eficiente no combate a reprodução assexuada, a qual pode representar significativa importância para contextos locais (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2013).

Segundo Ruocco *et al.* (2016), outra possibilidade, agora destinada ao momento pós-colheita, é o aprimoramento do tradicional tratamento térmico pelo qual as castanhas geralmente são submetidas no armazenamento, adicionando à água uma mistura de enzimas degradantes recolhidas de culturas de *Trichoderma harzianum* Rifai. Os autores relataram que este método foi capaz de reduzir significativamente a incidência de

podridões nas castanhas. Outra estratégia biológica foi descrita por Pasche *et al.* (2016b), utilizando o fungo *Trichoderma atroviride* P. Karst. e a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) como antagonistas endofíticos, ao tratarem mudas de castanheiro com suspensões de inóculo destes dois agentes, antes da enxertia. Os autores sugeriram que inoculações preventivas destes antagonistas endófitos podem ser eficazes no biocontrole de *G. smithogilvyi*, uma vez que o fitopatógeno estava ausente onde tais espécies antagônicas colonizaram endofiticamente o tecido lenhoso da planta.

Destaca-se também a importância e a necessidade de se conduzirem mais testes que estudem a patogenicidade e a virulência do fungo em diferentes hospedeiros e variedades de castanheiro, em busca de cultivares mais resistentes ou tolerantes ao fungo (Lione *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TESTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Gnomoniopsis smithogilvyi*

3.1.1 Material Biológico

Castanhas

Os experimentos foram conduzidos com três variedades de castanha europeia (*C. sativa*), Judia, Longal e Martáinha, que representam as variedades de maior significado da DOP-Terra Fria, do Nordeste Transmontano, Portugal. As castanhas foram fornecidas pela empresa Sortegel (Sortes, Bragança), oriundas da região produtora de Trás-os-Montes, Portugal, da safra 2019/2020. Assim que recebidas e já devidamente identificadas, as amostras foram acondicionadas em sala refrigerada a 4 °C até o momento de sua utilização.

Fungos

Os fungos utilizados nesta pesquisa foram isolados de castanhas e anteriormente identificados molecularmente por Driss (2019). Para o teste de patogenicidade e virulência foram usados dois isolados de *Gnomoniopsis smithogilvyi* (P7/D-15, isolado de castanhas armazenadas sem esterilização e amostrado após 15 dias de armazenamento, e P10/5-10, isolado de castanhas rejeitadas após seleção manual, segundo Driss (2019)), recodificados para o presente estudo como G1 e G2, respectivamente. Este material estava armazenado a -20 °C em 30% glicerol com 0.1% de Tween 80.

Com intuito de garantir o uso de culturas puras, foram obtidas culturas monospóricas a partir do material conservado. Primeiramente, repicaram-se os fungos de interesse para placas de Petri contendo meio de cultivo *Potato Dextrose Agar* (PDA, Biolife, Itália), e foram incubados durante 7 dias a 25 °C. Com a ajuda de uma ansa recolheu-se um conjunto de esporos da placa de Petri e misturou-se numa solução aquosa de 0,1% Tween 80. Esta suspensão foi homogeneizada e foram preparadas diluições 10^{-1} e 10^{-2} . Posteriormente foram colocados 100 µL de cada suspensão em meio PDA de maneira uniforme, utilizando um espalhador em forma L, e incubaram-se as placas a 25

°C por 24 horas. Com o auxílio de uma lupa foram feitas repicagens de esporos germinados para placas de Petri contendo meio PDA.

3.1.2 Desenho Experimental

Os testes foram efetuados com duas estirpes de *G. smithogilvyi* (G1 e G2), nas três variedades de castanha. Para cada binómio fungo x variedade, os fungos foram semeados de três formas diferentes: castanha inteira, castanha furada e castanha cortada transversalmente. Para cada tratamento foi usada uma testemunha sem inoculação. Cada tratamento foi aplicado a 6 castanhas, para que a avaliação pudesse ser feita em 2 tempos diferentes de incubação (3 castanhas x 2 tempos de análise).

Cada tratamento foi realizado em frascos de vidro com tampa de rosca, contendo 3 castanhas (Figura 3.1), num total de 48 frascos e 144 castanhas.

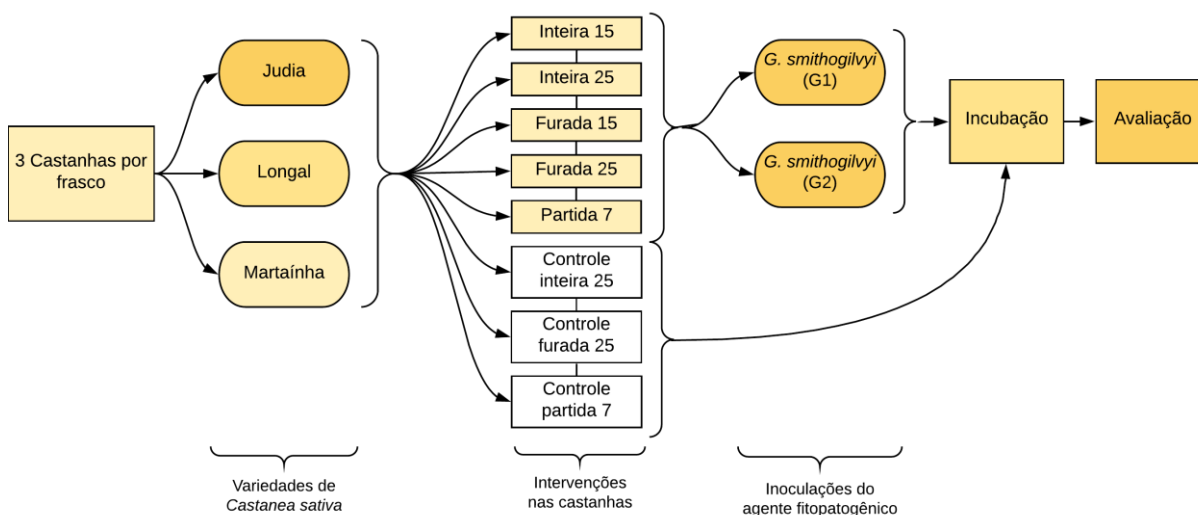


Figura 3.1. Fluxograma do teste de patogenicidade e virulência de *G. smithogilvyi* em *Castanea sativa*. As intervenções nas castanhas nomeadas com 7, 15 e 25 correspondem aos diferentes tempos de incubação de cada tratamento. Os tratamentos controle não receberam inoculação de agentes fitopatogênicos.

3.1.3 Preparação das Castanhas

Fez-se uma inspeção visual e manual das castanhas, eliminando as que apresentassem defeitos externos, como por exemplo, sinais ou coloração incomuns, rachaduras, consistência tenra, sinais de infestação (buracos externos causados por pestes

da castanha), ou sinais de infecção fúngica, como o crescimento externo de micélio ou esporulação de fungos.

As castanhas selecionadas foram colocadas em bandejas identificadas com o nome da variedade e lavadas em água corrente, esfregando-se a película externa de cada uma das castanhas manualmente, para limpeza superficial. Em seguida, dentro de uma cabine de fluxo laminar horizontal, fez-se a desinfecção superficial das castanhas com lixívia comercial a 10% (hipoclorito de sódio 0,5%) durante 5 minutos, em Goblés previamente esterilizados. As castanhas foram enxaguadas 3 vezes com água esterilizada, e finalmente colocadas sobre folhas de papel-toalha esterilizadas para secar sob luz ultravioleta por aproximadamente 20 minutos.

3.1.4 Preparação das Suspensões de Esporos

Em tubos Falcon identificados com o código de cada estirpe, colocaram-se 5 mL de solução 0,9% NaCl e 0,1% Tween 80 estéril, e com ansas descartáveis, raspavam-se separadamente as colônias dos fungos fitopatogênicos testados e foram colocadas na solução. As suspensões foram homogeneizadas com um agitador vortex, por aproximadamente 10 segundos. Os esporos foram contados usando uma câmara de Neubauer. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 2×10^7 esporos/mL e foram utilizadas para as inoculações nas castanhas.

3.1.5 Inoculação das Castanhas e Incubação

Visando confirmar a capacidade do fungo *G. smithogilvyi* de provocar infecção nas castanhas e de ser o agente causal da podridão castanha da castanha europeia, em Portugal, efetuaram-se testes de patogenicidade (capacidade de infetar e causar doença) e de virulência (intensidade da doença causada), e aplicaram-se os postulados de Koch.

Para o tratamento com intervenção “furada”, e com o auxílio de uma agulha de inoculação, fizeram-se três furos em cada uma das castanhas, um na região do hilo, outro na região próxima ao eixo do embrião e outro no centro do fruto (Figura 3.2a), sempre flambando a agulha para evitar contaminações cruzadas. Em seguida, com uma pinça, três castanhas foram dispostas em cada frasco. Semearam-se uma gota de 20 µL de suspensão de esporos sobre cada um dos furos (Figura 3.2b).

No tratamento “inteira”, 3 castanhas foram colocadas em cada frasco com o auxílio de uma pinça, em seguida, foram individualmente semeadas com três gotas de suspensão de esporos de 20 µL, uma na região do hilo, outra na região próxima ao eixo do embrião e outra no centro do fruto (Figura 3.2c).

Para o tratamento com intervenção “cortada”, cortaram-se as castanhas longitudinalmente utilizando um bisturi. Igualmente aos demais tratamentos as castanhas foram colocadas nos frascos e distribuídas de forma que não se sobrepusessem umas às outras. Semearam-se uma gota de 20 µL de suspensão de esporos na parte interna exposta de cada um dos cotilédones (Figura 3.2d).

Ao final das semeaduras os frascos de todos os tratamentos foram fechados e incubados a 25 °C até ao momento da avaliação. Todos os utensílios utilizados para a manipulação das amostras foram previamente esterilizados e os procedimentos conduzidos em uma câmara de fluxo laminar horizontal.

O tempo de incubação dos testes com *G. smithogilvyi* foi de 7 dias para o tratamento Partida7 e controle da partida; 15 dias para Furada15 e Inteira15; e 25 dias para Furada25, Inteira25 e respectivos controles.



Figura 3.2. Preparação das castanhas e inoculação de suspensão de esporos de *G. smithogilvyi*. A) Castanhas perfuradas na região do hilo, no eixo do embrião e no centro do fruto. B) Inoculação das castanhas no tratamento “Furada”, gotas sobre os furos. C) Inoculação das castanhas do tratamento “Inteira”. D) Inoculação nos cotilédones das castanhas sob o tratamento “Partida”.

3.1.6 Avaliação da Taxa de Infecção das Castanhas Inoculadas com *G. smithogilvyi*

Para avaliar a ocorrência e taxa de infecção das castanhas previamente inoculadas, as castanhas foram cortadas ao meio no sentido longitudinal (exceto os tratamentos nos quais as castanhas foram previamente cortadas), e classificou-se a porcentagem de crescimento fúngico ou de podridões nas castanhas conforme os níveis propostos por Donis-González *et al.* (2016): Nível 0 (N0): nenhum crescimento fúngico visível; Nível 1 (N1): 1-25% da superfície interna da castanha coberta por fungos; Nível 2 (N2): 26-50%, Nível 3 (N3): 51-75% e Nível 4 (N4): 76-100%. Fez-se a média dos valores das três castanhas de cada frasco para gerar o nível de infecção de cada tratamento.

3.1.7 Verificação dos Postulados de Koch

Os postulados de Koch foram verificados a partir das castanhas inoculadas com *G. smithogilvyi* e que mostraram desenvolvimento de podridão castanha. O fungo associado à podridão foi repicado com uma agulha para placas de Petri de 55 mm contendo meio de cultivo PDA. Após a incubação de aproximadamente 7 dias a 25 °C, os fungos foram identificados morfolologicamente. A macromorfologia foi avaliada a olho nu e a lupa (Leica MZ95), por comparação do crescimento em placa com as colônias originais de *G. smithogilvyi*, e a micromorfologia foi avaliada por observação ao microscópio óptico (Leica DM2000), com montagem em azul de algodão.

3.1.8 Determinação da Taxa de Infecção Natural das Castanhas

O presente teste foi efetuado para quantificar a ocorrência de fungos vivendo de forma endofítica nas castanhas, os quais não foram possíveis eliminar através da desinfecção externa com hipoclorito de sódio. Utilizaram-se 36 frascos de vidro e 108 castanhas no total (36 de cada variedade). Foram empregados os mesmos procedimentos para a seleção e desinfecção das castanhas descritos anteriormente. Aplicaram-se 4

tratamentos em cada variedade: Partida e Inteira (7), ambas com 7 dias de incubação a 25 °C; Inteira (14) com 14 dias de incubação e Inteira (21) com 21 dias de incubação. Todas os tratamentos foram compostas por 3 réplicas (A, B e C), como ilustra a Figura 3.3.

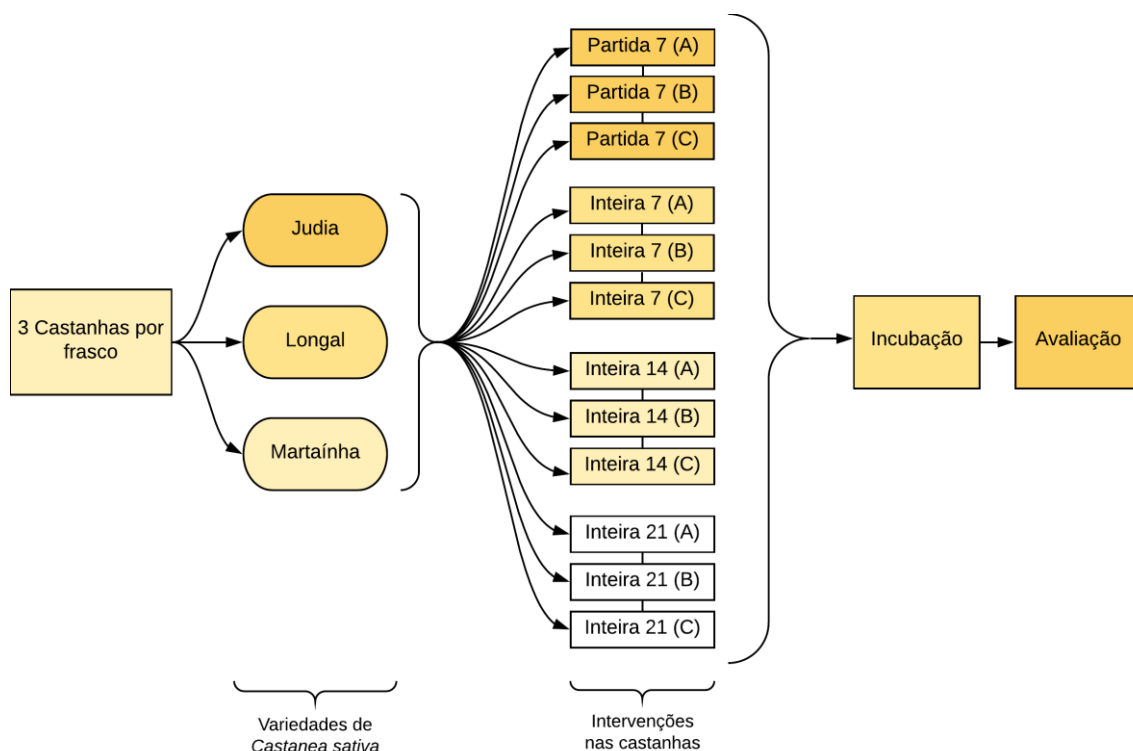


Figura 3.3. Fluxograma do teste para a determinação da taxa de infecção natural em *Castanea sativa*. Tratamentos conduzidos em triplicata (A, B e C). Os tempos de incubação correspondem aos números indicados 7, 14 e 21 dias.

Para a avaliação deste teste, estimaram-se os percentuais de todos os apodrecimentos internos das castanhas, e não somente aqueles característicos de *G. smithogilvyi*, para estimar a quantidade de fungos endofíticos presentes no interior dos frutos, e que a desinfecção superficial com hipoclorito de sódio + exposição a luz ultra violeta por 20 minutos, não foi suficiente para os eliminar. Calculou-se a média entre as três castanhas que compunham cada frasco, e dos três frascos (A, B e C) que compunham a triplicata, num total de 9 castanhas de cada variedade para cada tratamento (n=9). Fez-se a média entre as réplicas de cada teste e a partir dos valores estimou-se o Nível de Infecção Interna (Donis-González *et al.*, 2016).

3.2 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E ECOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS PORTUGUESES DE *Gnomoniopsis smithogilvyi*

Tendo em conta que os estudos de Coelho & Gouveia (2017), Driss (2019) e Cuamba (2020), reportam pela primeira vez o isolamento e identificação de *G. smithogilvyi* em Portugal, considerou-se de elevada importância a caracterização ecofisiológica e taxonômica dos isolados portugueses.

Os estudos de taxonomia incluíram a caracterização macro e micromorfológica dos isolados portugueses, identificação molecular e comparação com estirpes de diferentes origens geográficas mundiais, avaliadas e caracterizadas noutros estudos (Shuttleworth *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012). A caracterização ecofisiológica envolveu ensaios de crescimento a diferentes temperaturas e em diferentes substratos.

3.2.1 Material Biológico

No presente estudo foram usados três isolados de *Gnomoniopsis smithogilvyi* (P7/D-15 e P10/5-10, cuja proveniência já foi descrita na sessão 4.1.1, e P8/4-9, isolado de castanhas armazenadas sem esterilização e amostrado após 30 dias de armazenamento, segundo Driss (2019)); recodificadas para os testes como G1, G2 e G3, respectivamente. Estes fungos foram obtidos conforme descrito na secção 4.1.1.

3.2.2 Preparação dos Meios de Cultura

A taxa de crescimento e produção de esporos dos isolados foi avaliada usando três meios de cultura: *Potato Dextrose Agar* (PDA, Biolife, Itália), *Malt Extract Agar* (MEA, Himedia, Itália) e Meio de Castanha (MC). O MC foi usado como modelo, numa aproximação às condições físico-químicas da castanha. Os meios PDA e MEA foram usados como meios exógenos padrão, para posterior comparação com os resultados obtidos em estudos com estirpes de *G. smithogilvyi* provenientes da Itália e Nova Zelândia (Visentin *et al.*, 2012).

Os meios de cultura PDA e MEA foram preparados segundo as indicações dos fabricantes. Para a preparação do MC, selecionou-se 1 kg de castanhas das três variedades (Judia, Longal e Martaínha) que estivessem em boas condições visuais, e lavou-se em

água corrente. Fez-se pequenas incisões nas castanhas e colocou-se em um Goblé, preencheu-se com água até a submersão das mesmas e cozinhou-se por aproximadamente 15 minutos em micro-ondas, até atingirem uma consistência tenra. Posteriormente, descascou-se as castanhas com uma faca e triturou-se com um triturador de alimentos. Para a preparação do meio de cultura, para cada 1 L de água destilada incorporaram-se 200 g de polpa de castanhas e 50 g de Agar. Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos, e plaqueados em cabine de fluxo laminar horizontal.

3.2.3 Estudos de Taxonomia

Inoculação dos isolados

Preparou-se uma suspensão na concentração 3×10^7 esporos/mL de cada estirpe, seguindo a metodologia descrita na secção 4.1.4. As placas de Petri dos três meios de cultura foram semeadas centralmente com uma gota de 20 µL de cada suspensão de esporos, e foram incubadas a 25 °C durante 7 dias. Cada tratamento foi conduzido em triplicado.

Medição de conidiomata e de conídios

As conidiomata foram medidas após 7 dias de incubação, utilizando uma lupa Leica MZ95 em conjunto do programa Leica Application Suite V4 (LAS V4.12). Em função da heterogeneidade do formato das conidiomata, foram medidas no sentido longitudinal e transversal, evitando-se aquelas que pela proximidade e o grande tamanho, estivessem ligadas umas às outras, conforme ilustra a Figura 3.4. Obteve-se, no mínimo, 50 medições de conidiomata para cada um dos tratamentos.

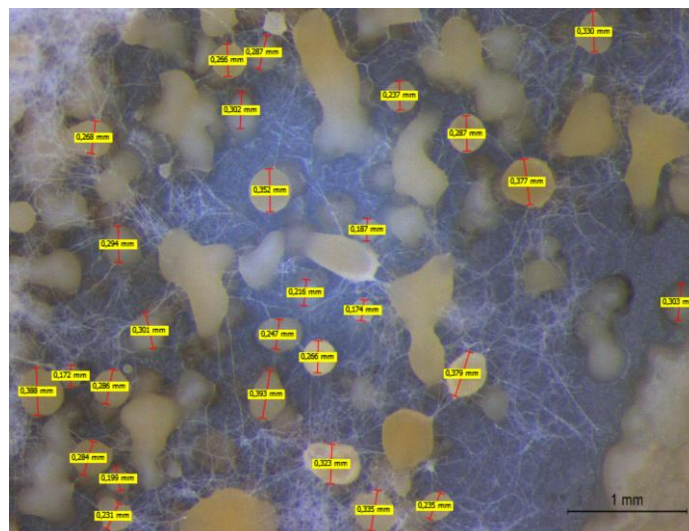


Figura 3.4. Exemplo do processo de medições das conidiomata de *G. smithogilvyi* em meio de cultivo PDA incubado por 7 dias a 25 °C, usando o programa Leica Application Suite V4.

Para a medição dos conídios, preparou-se montagens em azul de algodão de cada isolado de *G. smithogilvyi*. Em seguida, observou-se ao microscópio óptico (Leica DM2000) e com o programa Leica Application Suite V4 (LAS V4.12) fez-se, para cada amostra, 100 medições de esporos nos sentidos longitudinal e transversal (Figura 3.5). As estruturas macro- e microscópicas foram fotografadas usando uma câmara digital acoplada à lupa e ao microscópio. As medições das conidiomata foram expressas em milímetros, e a dos conídios foram expressos para comprimento e largura, no seguinte formato: (mínimo)-médio-(máximo) μm (*comprimento*) x (mínimo)-médio-(máximo) μm (*largura*).

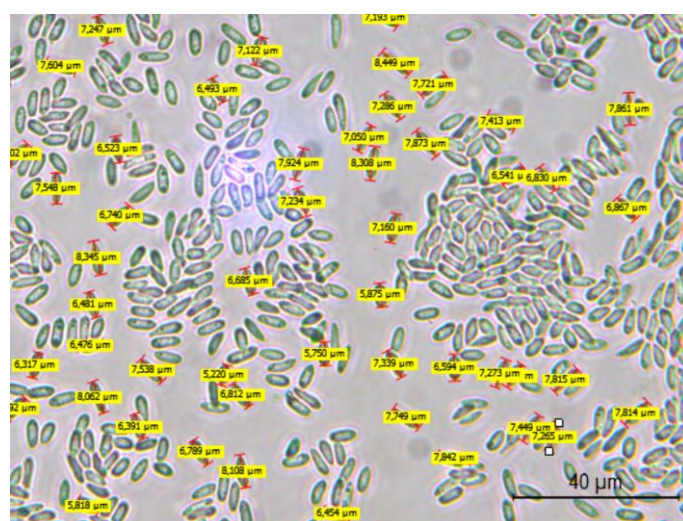


Figura 3.5. Exemplo do processo de medições dos conídios de *G. smithogilvyi* em meio de cultivo PDA incubado por 7 dias a 25 °C, usando o programa Leica Application Suite V4.

3.2.4 Caracterização Ecofisiológica

Para determinação da taxa de crescimento dos isolados, preparou-se uma suspensão na concentração 3×10^7 esporos/mL de cada estirpe, seguindo a metodologia descrita na secção 4.1.4. As placas de Petri dos três meios de cultura foram semeadas centralmente com uma gota de 20 μ L de cada suspensão de esporos, e foram incubadas a 5, 12, 20, 25, 30 e 35 °C. Cada tratamento foi conduzido em triplicado.

Com o auxílio de uma régua, o diâmetro das colônias dos 51 tratamentos foi medido no sentido transversal e longitudinal diariamente durante 9 dias ou até a colonização completa da placa de Petri (diâmetro máximo 8,5 cm). A partir destes dados, foram calculados os seguintes parâmetros de crescimento:

- i) Duração da fase lag (λ , em dias), correspondente ao número de dias entre a inoculação e a observação de crescimento;
- ii) Taxa média de crescimento (κ , cm por dia), calculado como o declive da reta de regressão linear do raio da colónia (na fase exponencial) em função do tempo de incubação;

Contagem de esporos

Ao nono dia de incubação, após a conclusão das medições de crescimento, selecionaram-se duas placas de cada tratamento para a contagem de esporos. Com uma pipeta descartável, despejou-se cerca de 2 mL de uma solução de 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 80. Com a própria pipeta raspou-se toda a placa de Petri, liberando os esporos presentes na colónia. A suspensão de esporos foi transferida integralmente para tubos falcon identificados com o código correspondente. Repetiu-se esta operação até a obtenção de 10 mL de suspensão para cada placa. Homogeneizaram-se as suspensões com um agitador vortex por aproximadamente 10 segundos. Em seguida, com uma micropipeta, retirou-se uma alíquota da suspensão e colocou-se em uma câmara de Neubauer para efetuar a contagem dos esporos ao microscópio óptico.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Gnomoniopsis smithogilvyi*

3.3.1 Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo SDS descrito por Rodrigues et al. (2018). Com uma alça raspavam-se colônias frescas crescidas em meio PDA dos fungos de interesse (G1, G2 e G3, descritos anteriormente, e mais um quarto isolado, P6/4-12, isolado de castanhas amostradas no armazém da indústria imediatamente após a recepção, sem esterilização, segundo Driss (2019), e recodificado para o presente estudo como G4) para obtenção de esporos e/ou micélios, transferiu-se este material para tubos eppendorf contendo 300 µL de tampão de lise SDS a 0,5% (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) e 0,5 g de esferas de vidro estéreis com um diâmetro de 0,4 a 0,6 mm (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Em um vórtex, agitou-se durante 5 minutos na velocidade máxima, promovendo o rompimento mecânico das paredes celulares. Precipitou-se os polissacarídeos e as proteínas pela adição de 500 µL de acetato de sódio 3M refrigerado (pH 5.5), misturou-se gentilmente por inversão e em seguida armazenou-se a -20 °C por 30 minutos. Depois disso, centrifugou-se a solução a 10.000 rpm por 10 minutos (4 °C) para separação de fases. O sobrenadante limpo foi recuperado e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 10 minutos (4 °C). Posteriormente, misturou-se o sobrenadante com um volume de isopropanol previamente refrigerado (-20 °C) para precipitar o DNA. Misturou-se a solução por inversão durante alguns minutos e incubou-se a -20 °C por uma hora. Por fim, centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos (4°C), lavou-se o sedimento de DNA duas vezes com 500 µL de etanol 70% frio (-20 °C) e centrifugou-se a 10.000 rpm por 7 minutos (4 °C). Depois de descartar o etanol, secou-se o DNA precipitado em estufa a 50 °C. Dissolveu-se o DNA em água ultrapura (30 a 50 µL, dependendo do rendimento), e armazenou-se a -20 °C.

3.3.2 Eletroforese do DNA

A qualidade e a concentração de DNA genômico foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE: 40 mM Tris-

HCl; 40 mM ácido acético; 1.0 mM EDTA, pH 8.0) corado com GelRed (Biotium). Carregou-se em cada um dos orifícios do gel uma mistura de 3 µL de DNA genômico de cada fungo e 0,5 µL de tampão de deposição da amostra 6x (30% (v/v) glicerol, 0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25%). Fez-se as corridas em Tampão TAE com aparelho de eletroforese Mini-Sub® Cell (Bio-Rad), com voltagem constante de 70 V durante 45 minutos. Ao final da separação, visualizou-se o DNA sob luz ultravioleta e a imagem digital foi obtida utilizando o aparelho ChemiDoc™ XR+ em conjunto do software Image Lab™ (Bio-Rad).

3.3.3 Amplificação do DNA por PCR

Considerando as análises eletroforéticas, selecionaram-se os DNAs genômicos que demonstraram boa qualidade para amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). A região ITS do DNA ribossomal (gene rRNA) foi amplificada utilizando os iniciadores universais ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), que amplificam fragmentos com aproximadamente 600 pares de bases. O gene *Translation Elongation Factor 1-alpha* (*TEF1-α*) foi parcialmente amplificado com os pares de iniciadores EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (Carbone & Kohn, 1999) e EF1-1567R (5'-ACHGTRCCRATACCAACCRATCTT-3') (Rehner & Buckley, 2005), amplificando fragmentos com aproximadamente 1000 pares de bases. Executou-se as PCRs em um volume de reação de 25 µL em um termociclador BioRad, conforme o programa de amplificação descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Programa de amplificação por PCR para a região ITS e para o gene *TEF1-α*.

Etapas da amplificação	Condições
Desnaturação inicial	94 °C, 3 min
Desnaturação	94 °C, 30 seg
Emparelhamento	55 °C, 30 seg
Extensão	72 °C, 2 min
Extensão final	72 °C, 10 min

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese, conforme anteriormente descrito, mas usando géis de 1,2% de agarose. Para determinação do peso molecular e da

concentração dos fragmentos obtidos, usou-se o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (BIORON).

3.3.4 Purificação e Sequenciação dos Produtos de PCR

Previamente à sequenciação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit* de purificação GF-1 (Vivantis), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento realizou-se num sequenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems), por subcontratação do serviço à empresa STAB VIDA, Portugal. Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções, e uma sequência de consenso foi criada a partir da montagem e otimização dos cromatogramas usando o programa Sequencher. Em seguida, a sequência consenso foi usada para identificação dos organismos por comparação com a base de dados GenBank da NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). As sequências consenso editadas e otimizadas foram depositadas na plataforma GenBank da NCBI, com os códigos MW165483- MW165486 (região ITS) e MW170363- MW170366 (gene *TEF1-α*).

3.3.5 Análise filogenética dos isolados de *G. smithogilvyi*

As sequências obtidas neste estudo para a região ITS e gene *TEF1-α*, assim como sequências de referência retiradas da plataforma GenBank (Tabela 3.2) foram alinhadas usando o programa MEGAX versão 10.0 (Kumar *et al.*, 2018). A análise filogenética dos isolados foi inferida pelo método NJ (*Neighbor-Joining*). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969), conforme recomendado pelo programa MEGAX. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (por meio da opção de exclusão de pares). Quanto ao gene *TEF1-α*, foram incluídas a 1^a, 2^a e 3^a posições de codões não codificantes.

Tabela 3.2. Lista de isolados de *G. smithogilvyi* e isolados “outgroup”, país de origem do isolado e número de acesso GenBank usados para a análise filogenética dos isolados portugueses.

Espécie	Isolado	País	Hospedeiro	Número de acesso GenBank		Referência
				ITS	TEF1- α	
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Gs1	Portugal	<i>C. sativa</i> (fruto)	MW165483	MW170363	Este estudo
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Gs2	Portugal	<i>C. sativa</i> (fruto)	MW165484	MW170364	Este estudo
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Gs3	Portugal	<i>C. sativa</i> (fruto)	MW165485	MW170365	Este estudo
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Gs4	Portugal	<i>C. sativa</i> (fruto)	MW165486	MW170366	Este estudo
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Rb7/MUT401	Itália	<i>C. sativa</i> (fruto)	HM142946	JQ791198	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	VA8/MUT403	Itália	<i>C. sativa</i> (fruto)	HM142947	JQ791200	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	BvCo20/MUT418	Itália	<i>C. sativa</i> (fruto)	HM142950	JQ791202	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	CH2/MUT810	Suíça	<i>C. sativa</i> (fruto)	JQ898295	JQ791210	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	CH4/MUT814	Suíça	<i>C. sativa</i> (fruto)	JQ898297	JQ791199	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	CH3/MUT811	Suíça	<i>C. sativa</i> (fruto)	JQ898296	JQ791211	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	NZ11/MUT411	Nova Zelândia	<i>C. sativa</i> (fruto)	HM142948	JQ791201	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	FR/MUT815	França	<i>C. sativa</i> (fruto)	JQ898298	JQ791212	Visentin <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	CBS 130190 ^T	Austrália	Castanheiro	JQ910642	KR072534	Shuttleworth <i>et al.</i> , 2015
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	CBS 130189	Austrália	Castanheiro	JQ910643	KR072535	Shuttleworth <i>et al.</i> , 2015
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	B1P2GS0/1	Itália (Sardenha)	Galhas de castanheiro	LT593845	LT593848	Seddaiu <i>et al.</i> , 2016
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	LPPA-F-935	Espanha	Castanha	LT837820		Gonzalez, A.J. (2017; não publ.)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	THDAS2016_1120A	Reino Unido	Lesões de castanheiro	KY695232		Lewis <i>et al.</i> , 2017
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	MIFCC500	EUA (Michigan)	Castanha	MK554866		Sakalidis <i>et al.</i> , 2019
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	MIFCC501	EUA (Michigan)	Castanha	MK554867		Sakalidis <i>et al.</i> , 2019
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	RGM_2904	Chile	<i>C. sativa</i> (fruto)	MT413429	MT435531	Cisterna & Carrasco (2020; não publ.)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	RGM_2903	Chile	<i>C. sativa</i> (fruto)	MT413428	MT435530	Cisterna & Carrasco (2020; não publ.)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	SER8_E.4	Portugal	<i>C. sativa</i>	MN994421		Coelho & Gouveia (2020; não publ.)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	Brg-16	Portugal	<i>C. sativa</i>	MN960397		Coelho & Gouveia (2020; não publ.)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	E18/74-7	Eslovênia		MN187894		Ogris <i>et al.</i> (2020; não publ.)
<i>Gnomoniopsis paraclavulata</i>	CBS123202			GU320830	GU320815	Walker <i>et al.</i> , 2010

3.4 TESTE DE CRESCIMENTO EM CO-CULTURA COM *Trichoderma viridescens*

Com intuito de averiguar o potencial antagônico de *Trichoderma viridescens* (AS Horne & HS Will.) em relação ao patógeno *G. smithogilvyi*, aplicou-se o teste de pareamento ou crescimento em co-cultura, que consiste em confrontar ambos os fungos em uma mesma placa de Petri e a partir de medições, verificar se existe ou não inibição do crescimento micelial ou alteração das estruturas do fungo (Mariano, 1993). Para proporcionar condições mais próximas às que ocorrem naturalmente na castanha, os testes em placa foram realizados em meio de cultivo PDA e meio base de castanha (MC), descrito na secção 4.3.1.

3.4.1 Material Biológico

Para o presente teste foram usados dois isolados de *G. smithogilvyi* (G1 e G2) e dois isolados de *T. viridescens* (P6/4-22 e P8/4-6 segundo Driss (2019)) recodificados como “T1” e “T2”, respectivamente.

3.4.2 Desenho Experimental

Ao todo foram avaliadas 3 variáveis, cada uma com dois níveis, sendo elas: duas estirpes de *T. viridescens* (T1 e T2), duas estirpes de *G. smithogilvyi* (G1 e G2) e dois meios de crescimento (PDA e MC). Como testemunha, fez-se o cultivo de cada uma das estirpes em confronto consigo próprias. As combinações de confrontamento foram T1xT1, T1xG1, T1xG2, T2xT2, T2xG1, T2xG2, G1xG1 e G2xG2, nos dois meios de crescimento propostos e em triplicata.

3.4.3 Montagem do Teste de Co-cultura e Medição

A preparação das suspensões de esporos seguiu a metodologia descrita na secção 4.1.4 Com uma micropipeta e ponteiras esterilizadas, semeou-se 20 µL de suspensão de esporos na concentração aproximada de 1×10^7 esporos/mL, de acordo com as combinações de confrontamento indicadas anteriormente (com inoculação simultânea). Utilizou-se uma peça de cerâmica com duas demarcações para posicionar as gotas de

forma equidistante em todas as placas, que posteriormente foram incubadas a 25 °C no escuro.

Com uma régua, mediu-se o diâmetro das colônias no sentido longitudinal (D1) e transversal (D2), com 1, 2 e 4 dias de incubação. Para calcular a redução percentual de crescimento de *G. smithogilvyi* adaptou-se a formula proposta por South *et al.* (2020):

$$\text{Redução de crescimento D1 (\%)} = \frac{(D1_{\text{controle}} - D1_{\text{confrontamento}})}{D1_{\text{controle}}} \times 100$$

$$\text{Redução de crescimento D2 (\%)} = \frac{(D2_{\text{controle}} - D2_{\text{confrontamento}})}{D2_{\text{controle}}} \times 100$$

Comparou-se o diâmetro das colônias de G1 e G2 quando em co-cultura com T1 e T2 contra o diâmetro de G1 e G2 em co-cultura consigo próprio (Figura 3.6).

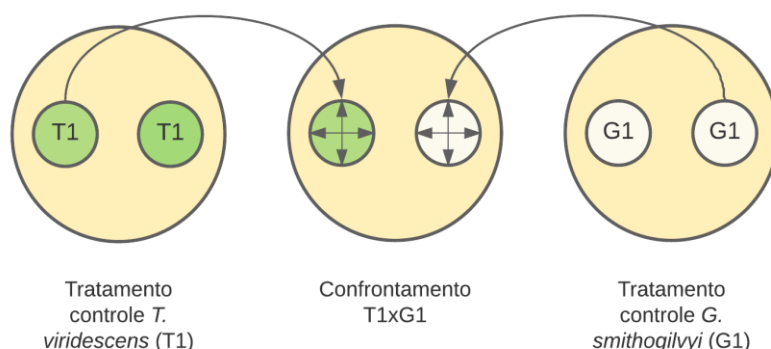


Figura 3.6. Esquema ilustrativo da comparação entre tratamentos utilizada para calcular a redução percentual de crescimento.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na avaliação do nível de severidade foram testados para a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados falharam neste critério, realizou-se o método de análise não paramétrico com o teste Kruskal-Wallis e post-hoc Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados com o auxílio do software IBM SPSS® Statistics versão 22.

Nos estudos de ecofisiologia dos fungos, o logarítmo (Ln) do crescimento diametral foi usado para determinar a taxa média de crescimento (κ), e o valor de R^2 foi

calculado para avaliar a aproximação entre os pontos experimentais e o modelo preditivo. Todos os valores de taxa de crescimento foram comparados para determinar diferenças significativas entre condições de crescimento através do programa GraphPad versão 8.0. para Windows (PRISM, 2020). Uma vez que os dados (brutos e transformados) falharam a premissa de normalidade, foi usada a análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis para grupos múltiplos independentes), seguida de testes de comparações múltiplas, para avaliar a influência dos meios de cultura (PDA, MEA e MC), estirpes (G1, G2 e G3) e temperatura (5, 12, 20, 25, 30 e 35 °C) nos parâmetros de crescimento - duração da fase lag, taxa média de crescimento - e esporulação. Usou-se o programa STATISTICA versão 10 (StatSoft, 2011).

Na análise do crescimento dos fungos em co-cultura, os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene), pelo que para a comparação de médias foi aplicada a análise ANOVA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Gnomoniopsis smithogilvyi* EM CASTANHA

4.1.1 Nível de Infecção Natural das Castanhas

A Figura 4.1 apresenta os resultados obtidos no teste de avaliação do nível de infecção fúngica interna de castanhas das variedades Longal, Judia e Martainha. Apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre as três variedades de castanha ($p=0.721$), os resultados estão apresentados para cada variedade, pelo interesse em avaliar o nível de podridões associado a cada variedade. Uma vez que também não se verificou diferença significativa entre os diferentes tempos de incubação das castanhas Inteiras (7, 14 e 21 dias) ($p=0.920$), estes dados foram agrupados e apresentados apenas para os diferentes tratamentos (Partida e Inteira).

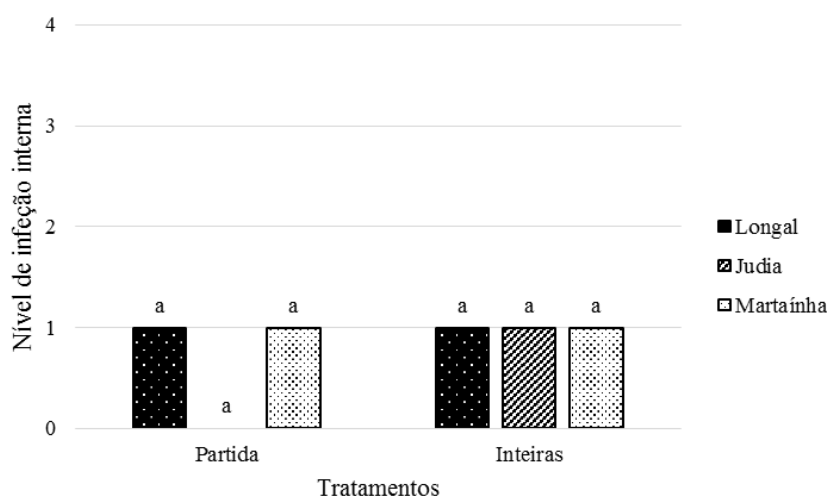


Figura 4.1. Nível de Infecção Interna natural das três variedades de castanha, obtido a partir do teste de incubação controle (sem inoculação de agente fitopatogênico).

Nota: letras iguais entre tratamentos significam diferença não significativa ($p>0.05$), determinado pelo teste Kruskal-Wallis

Nota-se que em todos os tratamentos, Partida e Inteira, houve o desenvolvimento de podridões causadas por fungos nas castanhas. Contudo, estas infecções internas não ultrapassaram o Nível 1 em nenhum tratamento. No tratamento partida, as castanhas da variedade Judia obtiveram nível de infecção interna inferior a N1, mas esta diferença não

foi significativa em relação as demais variedades. Na Figura 4.2, apresentam-se algumas castanhas de cada um dos tratamentos, como exemplo.

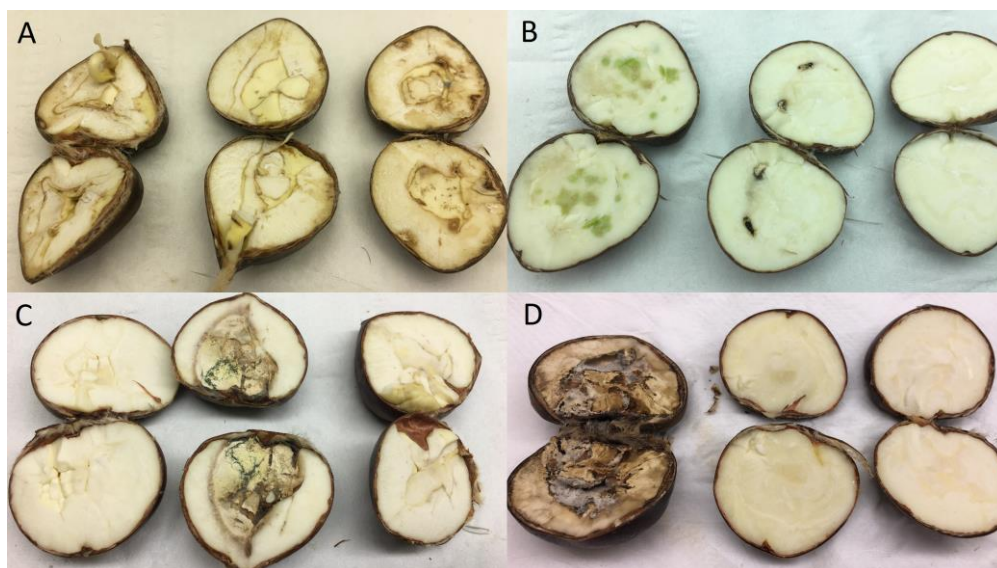


Figura 4.2. Avaliação do nível de infecção fúngica das castanhas. A) castanhas sob o tratamento Partida com 7 dias de incubação. B), C) e D) castanhas sob os tratamentos Inteira com 7, 14 e 21 dias de incubação, respectivamente.

Não sendo objetivo deste estudo identificar todos os fungos associados as podridões presentes nas amostras de castanhas analisadas, a identificação geral destes patógenos foi feita apenas a partir da observação dos sinais característicos das podridões, juntamente com a macromorfologia das colônias de fungos isoladas das respectivas podridões. Pode-se nomear a presença de *G. smithogilvyi* (causador da podridão castanha) (Figura 4.2d), e sobretudo a prevalência de *Penicillium* spp. (podridões verdes) (Figura 4.3a), como alguns dos agente fitopatogênicos presentes naturalmente no interior das castanhas.



Figura 4.3. A) Podridão por *Penicillium* spp. e *G. smithogilvyi* em castanhas submetidas ao tratamento Partida. C) e D) Alguns fungos isolados a partir das podridões internas de diferentes tratamentos, respectivamente *Penicillium* spp. e *G. smithogilvyi*.

Também foi possível observar que após alguns dias de incubação, algumas castanhas apresentaram esporulações fúngicas no exterior da casca, sem causarem podridão interna aparente (Figura 4.4a-b). Estes resultados confirmam o que apontam Wells & Payne (1975) e Rodrigues *et al.* (2013), de que algumas espécies de fungos, como *Penicillium* spp., são habitantes naturais da superfície dos frutos, mas não atuam necessariamente como causadores de dano interno. Algumas castanhas apresentaram também sinal de infecção entre a casca e a película que envolve o endosperma (Figura 4.4c), que ao longo do armazenamento poderá evoluir para infecção do endosperma.

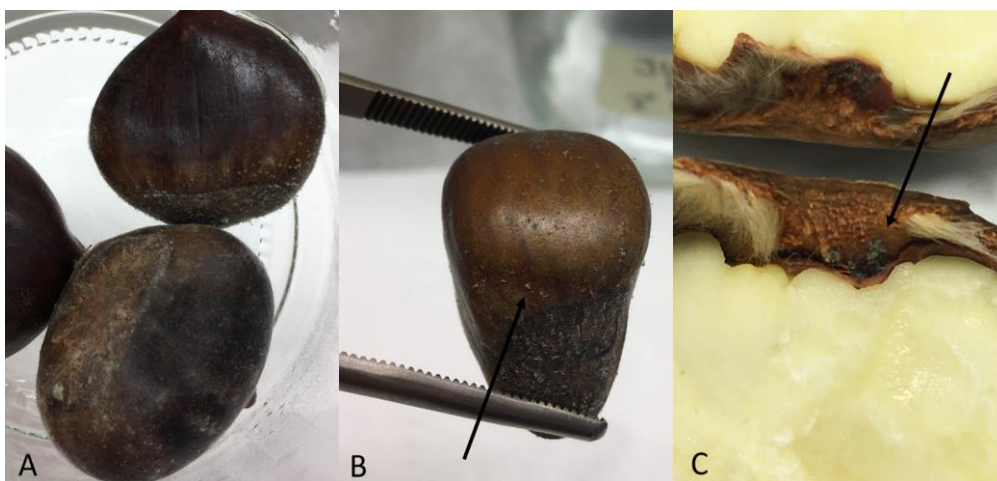


Figura 4.4. Castanhas sob o tratamento Inteira, após 21 dias de incubação. A) e B) Apresentando esporulações fúngicas no exterior da casca. C) Castanha cortada ao meio apresentando esporulação fúngica entre a casca e a película que envolve o endosperma.

O teste de infecção natural das castanhas mostrou que existem diferentes fitopatógenos, incluindo *G. smithogilvyi*, presentes endofiticamente nas castanhas de Trás-os-Montes, e distribuídos de maneira semelhante entre as três variedades estudadas (Judia, Longal e Martaínha). Driss (2019) relatou este fungo como agente causador de podridão castanha, com incidência média de 7,8% em castanhas não esterilizadas armazenadas por períodos até 30 dias, e 10% em castanhas rejeitadas (separadas devido a defeitos diversos). Coelho & Gouveia (2017) e Cuamba (2020) isolaram os fungos contaminantes de castanhas do campo, e reportaram uma frequência de isolamento (de entre todos os fungos isolados) de *G. smithogilvyi* de 9,3% e 15,3%, respetivamente.

Constatou-se, também, a prevalência de fungos do género *Penicillium* spp habitando o exterior das castanhas, e elevada quantidade de isolamento destes fungos associados ao interior dos frutos, mesmo não apresentando sintoma e sinal de infecção. Esta alta frequência de isolamento poderá ter resultado não só da existência interna de esporos de *Penicillium* sp., mas também da elevada resistência dos esporos ao processo de desinfecção superficial das castanhas com hipoclorito de sódio, antes de serem cortadas para avaliação. Deste modo, esporos de *Penicillium* spp. presentes na casca podem ter contaminado o endosperma e elevado a quantidade de isolamento destes fungos. Contudo, este ocorrido não compromete os resultados deste teste, uma vez que para gerar o nível de infecção interna, levou-se em consideração apenas os sinais de podridão.

4.1.2 Nível de Infecção das Castanhas Inoculadas com *G. smithogilvyi*

Neste ensaio foi avaliada a capacidade de infecção de castanhas aparentemente saudáveis, por duas estirpes do fungo patogênico *G. smithogilvyi*. Para tal, as castanhas foram inoculadas com o fungo por três processos diferentes: inoculação superficial da castanha intacta (Inteira), inoculação superficial da castanha danificada (Furada), e inoculação interna da castanha cortada (Partida). Após o período de incubação de cada tratamento, quantificou-se o percentual de podridão castanha (causada por *G. smithogilvyi*), para então gerar o Nível de Infecção Interna verificado em cada tratamento. A confirmação de *G. smithogilvyi* como agente causal das podridões foi feito a partir do reisolamento do fungo associado a podridão, verificando o cumprimento dos postulados de Koch.

Os resultados dos níveis de infecção interna das castanhas inoculadas com *G. smithogilvyi* estão apresentados na Figura 4.5 para a estirpe G1 e Figura 4.6 para a estirpe G2. Na análise geral dos dados, verificou-se maior nível de infecção nas castanhas inoculadas com a estirpe G1 do que com a estirpe G2 de *G. smithogilvyi*, o que pode sugerir que as diferentes estirpes do fungo apresentam diferentes capacidades infecciosas, no entanto, essa diferença não foi significativa ($p=0.774$). A diferença registrada entre as três variedades de castanhas também não foi considerada significativa ($p=0.596$). Em relação aos tratamentos, as castanhas com intervenção Partida e Furada (nos dois tempos de incubação) não diferiram significativamente entre si ($p=1.000$), mas ambos diferiram significativamente com os demais tratamentos ($p=0.000$). Os tratamentos Inteira (nos dois tempos de incubação) e todos os Controles (sem inoculação de *G. smithogilvyi*) não diferiram significativamente entre si ($p=1.000$).

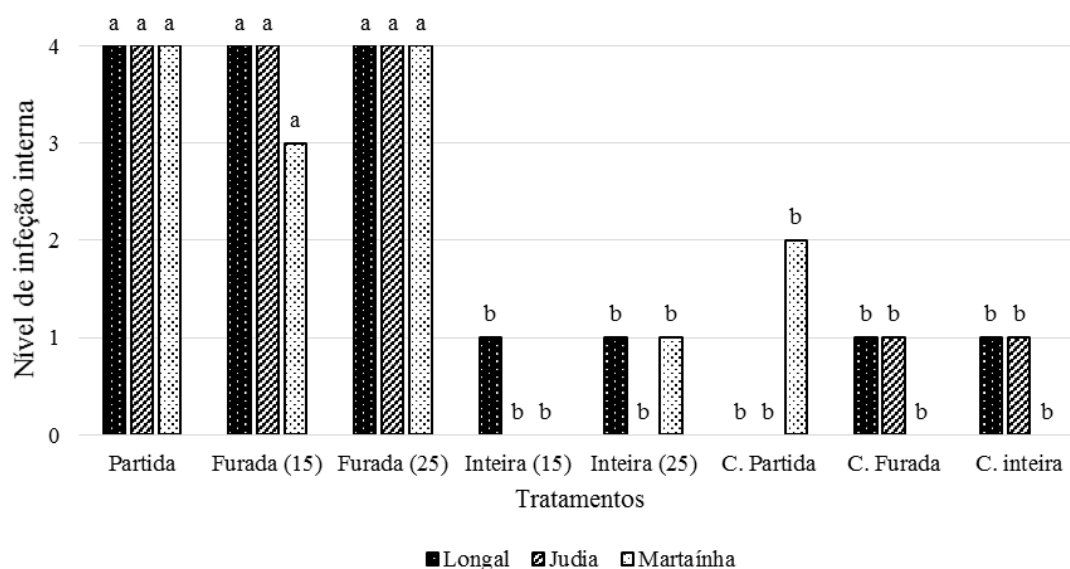


Figura 4.5. Nível de Infecção Interna das castanhas inoculadas com o isolado G1 de *G. smithogilvyi*. (N0): nenhum crescimento fúngico visível; (N1): 1-25% da superfície interna da castanha infetada; (N2): 26-50%, (N3): 51-75% e (N4): 76-100%. Nota: Letras diferentes entre tratamentos significam diferença significativa ($p<0.05$), determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

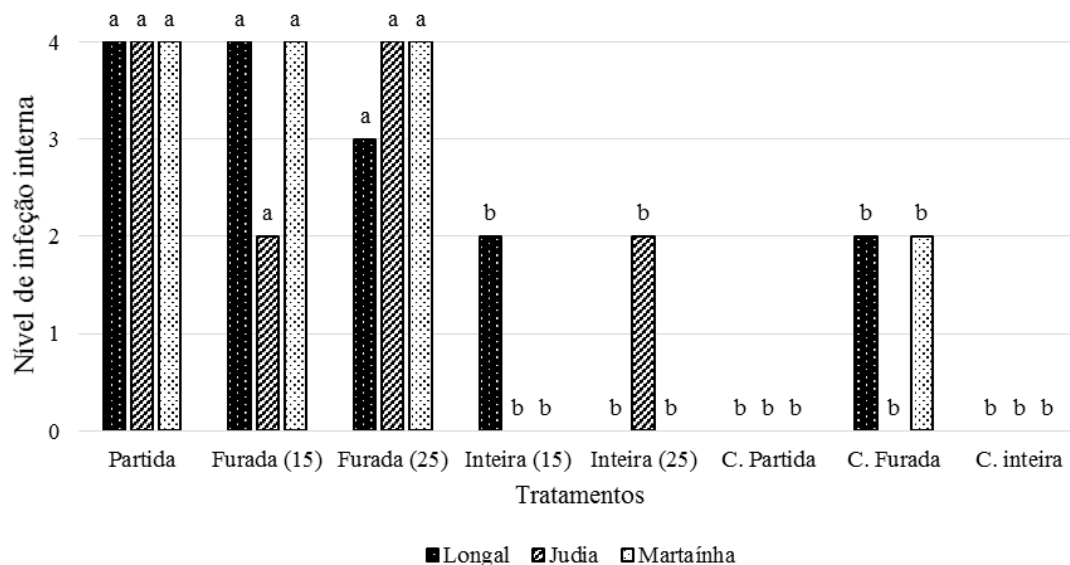


Figura 4.6. Nível de Infecção Interna das castanhas inoculadas com o isolado G2 de *G. smithogilvyi*. (N0): nenhum crescimento fúngico visível; (N1): 1-25% da superfície interna da castanha infetada; (N2): 26-50%, (N3): 51-75% e (N4): 76-100%. Nota: Letras diferentes entre tratamentos significam diferença significativa ($p < 0.05$), determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

Observa-se que nos tratamentos em que as castanhas foram cortadas ao meio (Partida), expondo os cotilédones ao agente fitopatogênico, 100% dos frutos tiveram a superfície interna infetada pelo fungo *G. smithogilvyi* (N4, Figura 4.7), o qual sempre foi reisolado, cumprindo os postulados de Koch (Figura 4.8).

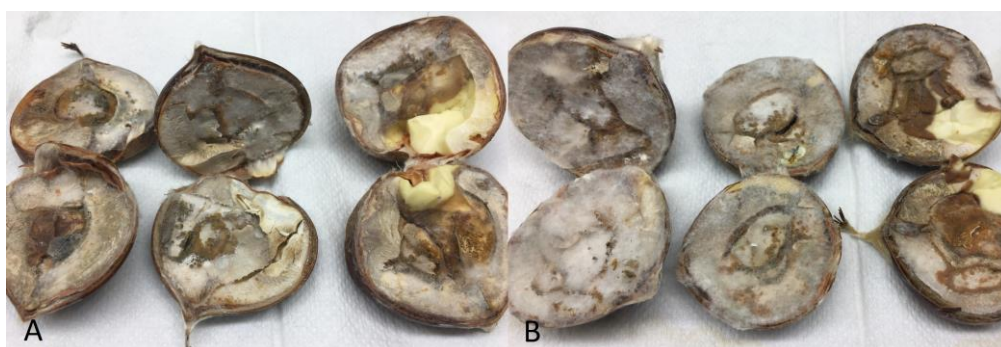


Figura 4.7. Castanhas sob o tratamento “Partida”, inoculadas com *G. smithogilvyi*, após 7 dias de incubação. A) Inoculadas com o isolado G1. B) Inoculadas com o isolado G2.

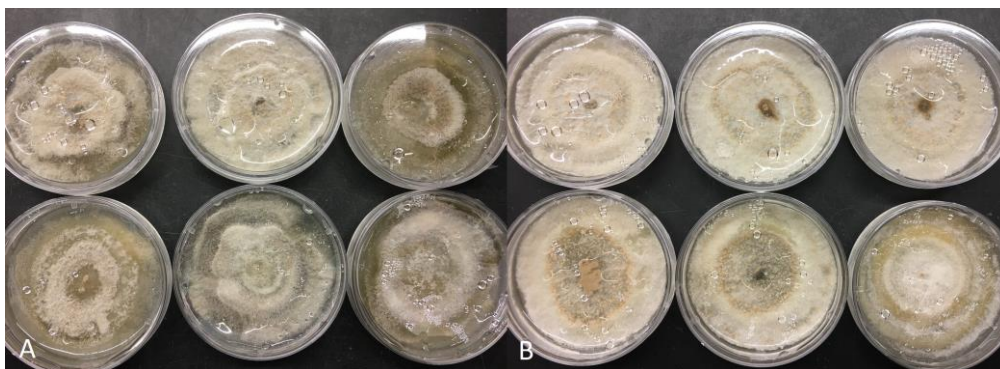


Figura 4.8. Colônias de *G. smithogilvyi* reisoladas das castanhas do tratamento Partida. A) e B) Isolados G1 e G2, respectivamente.

Nos tratamentos de castanhas Furadas, os dois tempos de incubação (15 e 25 dias) não diferiram significativamente entre si ($p=0.114$), indicando que 15 dias de incubação são suficientes para que *G. smithogilvyi* provoque infecção interna intensa nas castanhas (N4), sob estas condições. O Nível de Infecção Interna das castanhas neste tratamento foi maioritariamente (75%) N4. Na Figura 4.9, são apresentadas castanhas do tratamento furada, antes de serem avaliadas internamente, e na Figura 4.10, castanhas durante a avaliação.

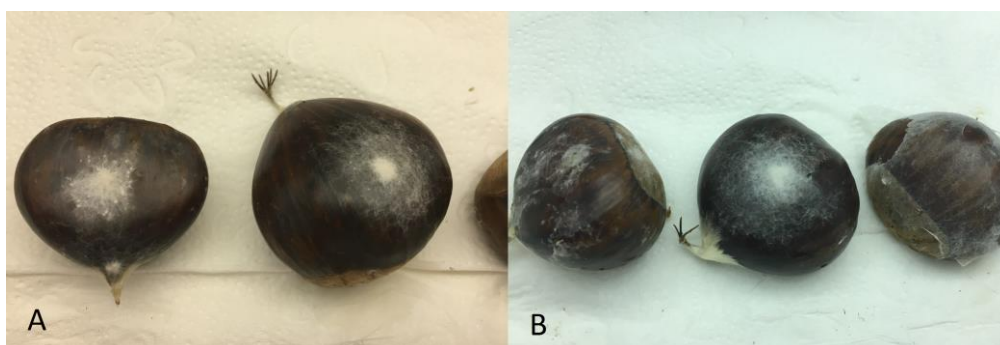


Figura 4.9. Crescimento micelial de *G. smithogilvyi* na região do furo e em torno das castanhas do tratamento furada (após 25 dias de incubação). A) Isolado G1. B) Isolado G2.

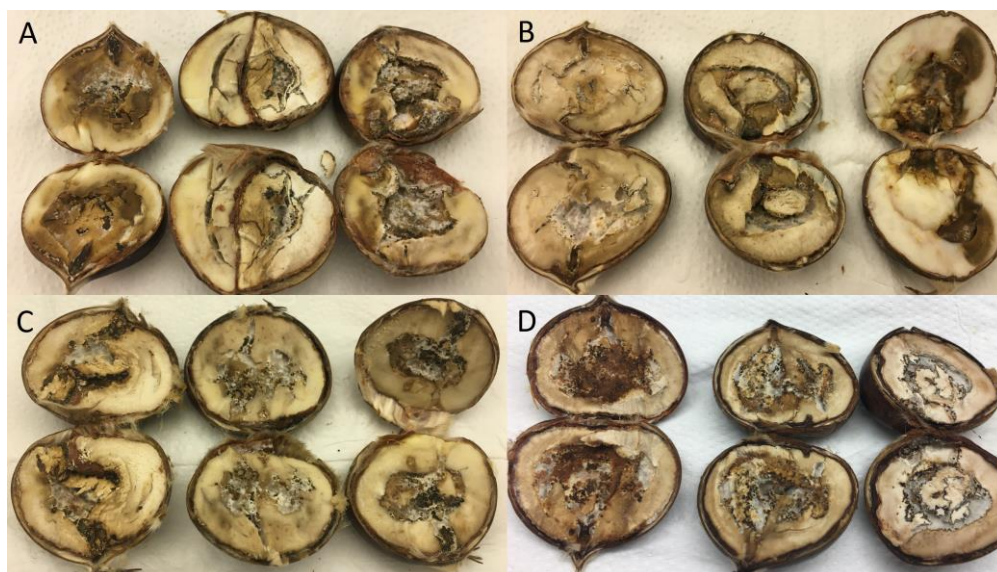


Figura 4.10. Castanhas sob o tratamento “Furada”, inoculadas com *G. smithogilvyi*. A) Inoculadas com o isolado G1, após 15 dias de incubação. B) G2, após 15 dias de incubação. C) G1, após 25 dias de incubação. D) G2, após 25 dias de incubação.

Observou-se, ainda, diferenças sintomáticas nas castanhas infetadas por *G. smithogilvyi* entre os tratamentos Partida e Furada. Nas castanhas previamente partidas houve, sobretudo, maior crescimento micelial na superfície da castanha, e intensa produção de conidiomata, enquanto que nas castanhas furadas, ocorreu pouca presença de micélio, mas também grande quantidade de conidiomata no centro oco das castanhas (Figura 4.11).



Figura 4.11. Detalhe para as características distintas entre as infecções causadas por *G. smithogilvyi* quando a castanha é partida (A) ou furada (B).

Nos tratamentos de castanhas Inteiras, os dois tempos de incubação (15 e 25 dias) também não diferiram significativamente entre si ($p=0.114$). O Nível de Infecção Interna das castanhas nestes tratamentos não ultrapassou N2, sendo maioritariamente (58,3%) N0, uma diferença significativa do nível de infecção ($p=0.000$), quando

comparado aos tratamentos furadas (N3 e N4) e partida (N4). Na Figura 4.12, são apresentadas algumas castanhas dos tratamentos Inteiras, no momento da avaliação.

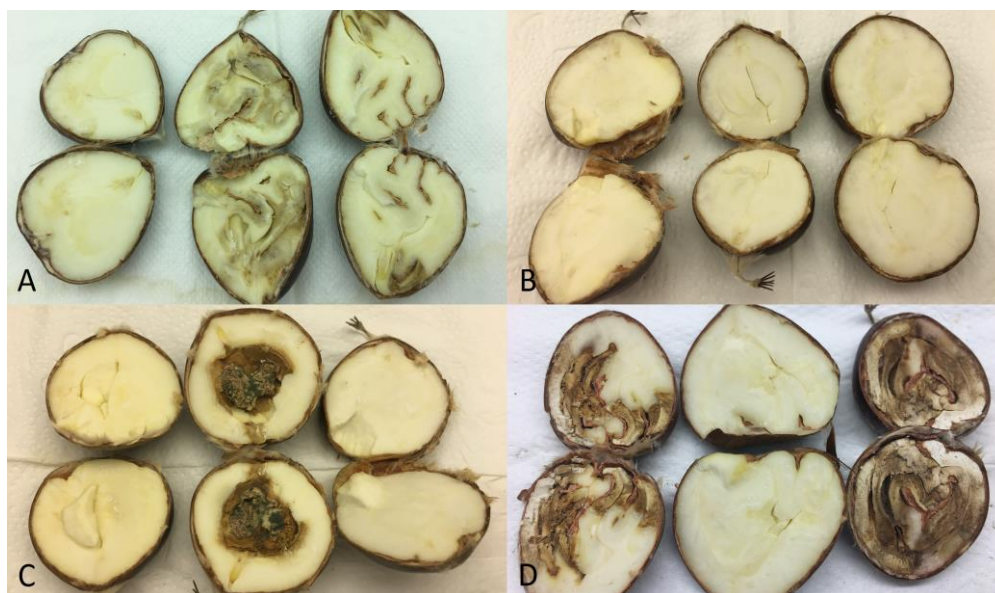


Figura 4.12. Castanhas sob o tratamento “Inteira”, inoculadas com *G. smithogilyvi*. A) Inoculadas com o isolado G1, após 15 dias de incubação. B) G2, após 15 dias de incubação. C) G1, após 25 dias de incubação. D) G2, após 25 dias de incubação.

Em relação aos tratamentos Controle (sem inoculação) - Controle Partida e Controle Furada - diferiram significativamente ($p=0.000$) dos respectivos tratamentos que receberam inoculação (Partida e Furada). Controle Partida teve Nível de infecção interna 91,6% inferior relativamente ao respectivo tratamento com inoculação (Partida). De forma semelhante, o tratamento Controle Furada apresentou Nível de infecção 73,9% menor do que o tratamento correspondente com inoculação (Furada). Por outro lado, o tratamento Inteira e seu respectivo Controle não diferiram significativamente entre si ($p=1.000$). Na Figura 4.13 apresentam-se algumas castanhas submetidas a cada um dos tratamentos controle.



Figura 4.13. Castanhas sob o tratamento controle, o qual não recebeu inoculação de *G. smithogilyvi*. A) Inteiras, após 25 dias de incubação. B) Furadas, após 25 dias de incubação. C) Partidas, após 25 dias de incubação.

A partir dos resultados do teste de patogenicidade e virulência de *G. smithogilvyi* em castanha, pode-se concluir que, de fato, este fitopatógeno isolado previamente (Driss, 2019) de castanhas provenientes de soutos em Trás-os-Montes, Portugal, é o agente causal da podridão castanha desta região. Apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre a virulência das duas estirpes de *G. smithogilvyi* estudadas, serão necessários estudos complementares com outros isolados do fungo e com maior número de castanhas inoculadas para verificar se existe ou não estirpes mais patogênicas e/ou virulentas em Portugal. Nenhuma variedades de castanhas estudada (Judia, Longal e Martaínha) demonstrou ter maior resistência ou tolerância a infecção pelo fungo *G. smithogilvyi*. Os resultados obtidos corroboram a ideia de que a casca da castanha, quando saudável e sem ferimentos provenientes da colheita ou perfurações de pragas, é capaz de evitar significativamente ($p=0.000$) a infecção por *G. smithogilvyi*, cumprindo a função de barreira natural contra infecções internas no fruto.

Os testes controle mostraram que mesmo sem a inoculação de *G. smithogilvyi* nas castanhas, a doença pode se manifestar em função da presença do fungo vivendo endofiticamente em alguns frutos, como relataram Visentin *et al.* (2012), Maresi *et al.* (2013) e Shuttleworth & Guest (2017). A desinfecção superficial das castanhas (em ambiente laboratorial) com hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos, seguida de exposição a luz UV por 20 min, não foram suficientes para a eliminação dos fungos presentes no interior da castanha. Prevê-se, com base nestes resultados, que tratamentos superficiais com agentes químicos ou físicos de baixa penetração (como são os exemplos anteriores) não serão adequados na desinfecção interna das castanhas em ambiente industrial, sendo necessário mais estudos relacionados com a eliminação de fungos endofíticos em castanha.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS PORTUGUESES DE *Gnomoniopsis smithogilvyi*

4.2.1 Caracterização Morfológica e Taxonômica

A caracterização morfológica das colônias de isolados portugueses de *G. smithogilvyi* foi efetuada sob condições padrão (meio de cultivo PDA e incubação a 25 °C), e comparando com as características descritas por Shuttleworth *et al.* (2012) e Visentin *et al.* (2012). Foram usados ainda meios de cultura não padronizados para este fungo (MEA e MC), como forma de complementar a caracterização do fungo.

Sob condições padrão, *G. smithogilvyi* produziu micélio lanoso e denso, de coloração esbranquiçada, com margens difusas a regulares, desenvolvendo-se em círculos concêntricos. A coloração da parte ventral das placas foi semelhante a coloração dorsal. O isolado G1 diferiu do isolado G2, em meio PDA, por apresentar estruturas concêntricas de micélios amarronzados a pretos (Figura 21). Em MC, a morfologia das colônias diferiu do crescimento em PDA principalmente pelo micélio mais proeminente e volumoso, e a produção de conidiomata em menor quantidade, porém de maior dimensão (Figura 4.14).

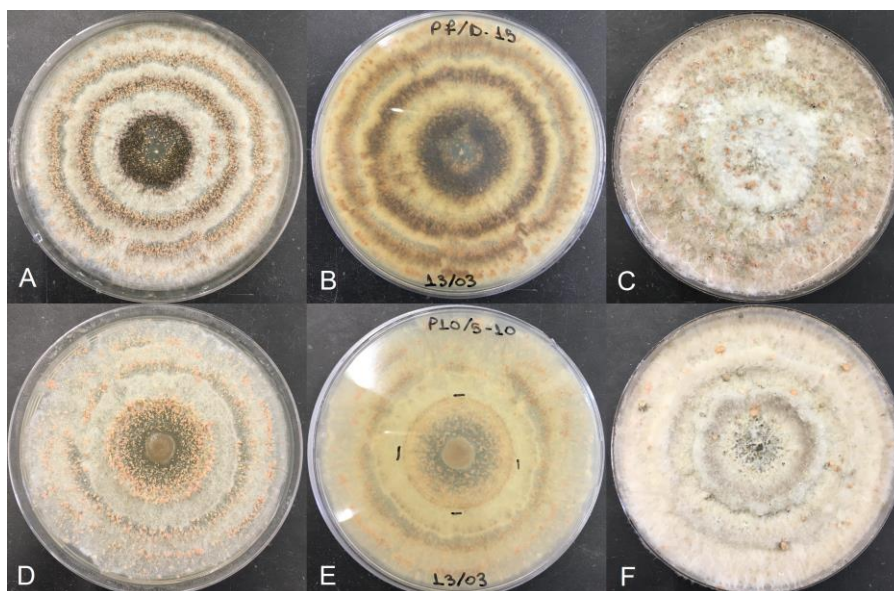


Figura 4.14. Colônias de dois isolados de *G. smithogilvyi* após 10 dias de incubação a 25 °C.

A) e B) isolado G1 em meio de cultivo PDA. Visão superior e do verso das placas, respectivamente. C) isolado G1 em MC. D) e E) isolado G2 em PDA. Visão superior e do verso das placas, respectivamente. F) isolado G2 em MC.

Conidiomata

As colônias exibiram intensa produção de conidiomata na superfície da placa (Figura 4.15a), característico das espécies de *Gnomoniopsis* (Sogonov et al., 2008). Conidiomata de formato globoso a subgloboso, de aspecto viscoso e de coloração variada entre o amarelo, creme e alaranjado (Figura 4.15b-c), que podem ser rompidas, liberando grande quantidade de esporos (conídios) (Figura 4.15d).

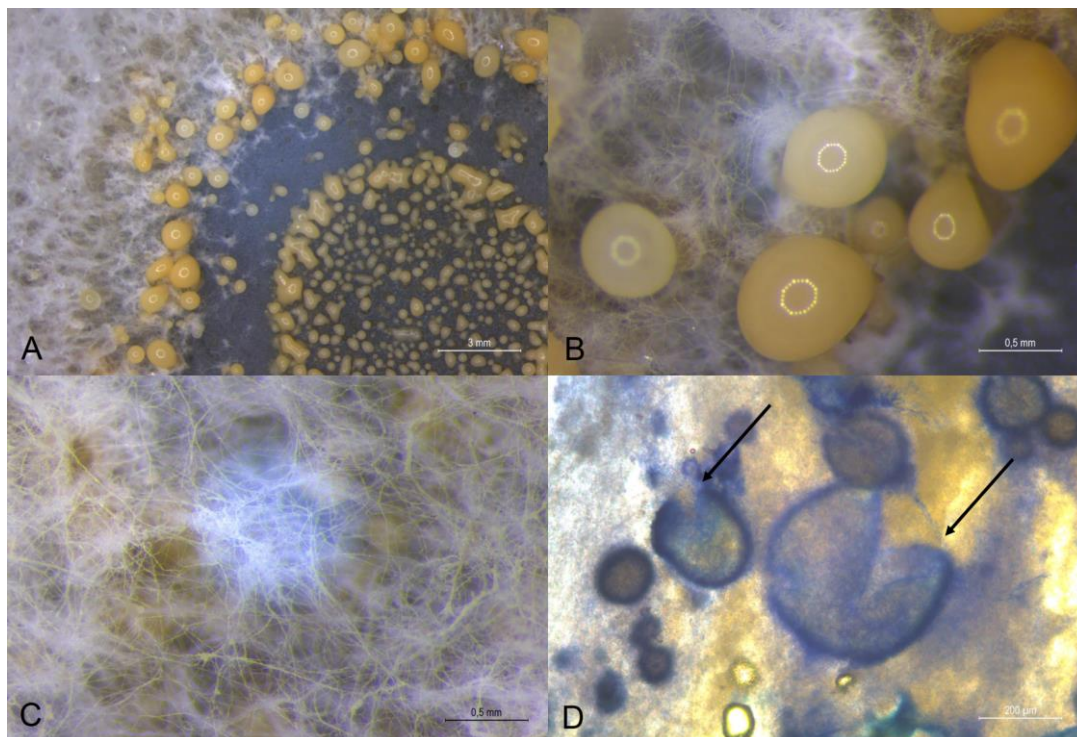


Figura 4.15. Morfologia de *G. smithogilyvi*, em meio PDA após 7 dias de incubação a 25 °C. A) Detalhe do centro da colônia rico em conidiomata. B) Detalhe de conidiomata. C) Estrutura micelial com conidiomata. D) Visão ao microscópio óptico de conidiomata rompida. Coloração artificial preparada com azul de algodão.

O tamanho das conidiomata variou em função do meio de cultivo empregado (PDA, MEA e MC) (Tabela 4.1). De modo geral, as menores médias do diâmetro de conidiomata foram obtidas das colônias em meio de crescimento MEA, variando entre 52,9 e 082,3 µm. Já as maiores médias do diâmetro de conidiomata foram obtidas das colônias em MC, variando entre 393,1 e 494,6 µm. As médias dos diâmetros das conidiomata das colônias crescidas em meio PDA foram intermédias entre os meios, variando entre 135,0 e 306,5 µm.

Tabela 4.1. Medições de conidiomata de três isolados de *G. smithogilvyi* em três meios de cultivo. (DP: desvio padrão, n: número amostrado)

Meio de cultivo	Isolado	Medição (µm)				n
		Mínimo	Média	Máximo	DP	
PDA	G1	073,5	220,0	473,9	089,3	70
	G2	172,3	306,5	498,5	062,0	61
	G3	022,1	135,0	508,4	135,5	63
	Média ± DP	089,3 ± 076,3	220,5 ± 085,8	493,6 ± 017,8		
MEA	G1	024,0	082,3	229,0	044,3	51
	G2	025,5	073,3	191,4	027,0	70
	G3	023,6	052,9	127,8	021,6	65
	Média ± DP	024,4 ± 001,0	069,5 ± 015,1	182,7 ± 051,2		
MC	G1	202,4	494,6	756,8	120,5	50
	G2	138,6	393,1	803,7	134,3	66
	G3	151,3	409,6	711,9	118,7	54
	Média ± DP	164,1 ± 033,8	432,4 ± 054,5	757,5 ± 045,9		

Comparativamente a outro estudo efetuado com estirpes com origem na Austrália, Shuttleworth *et al.* (2012) descrevem os conidiomata em PDA com dimensão média (84,5–) 203,5 (–488,5) µm de altura e (69,5–) 217,5 (–471) µm de largura, (média entre dimensões: (77–) 210,5 (–480) µm), e em MEA (69–) 245,5 (–449,5) µm de altura e (67,5–) 255 (–477,5) µm de largura, (média entre dimensões: (68,3–) 250,2 (–463,5) µm). Também em meio de cultivo PDA, Dar & Rai (2015) descrevem a dimensão de conidiomata de *G. smithogilvyi* provenientes da Índia, com os valores de (89,3–) 203,5 (–490,5) µm de altura e (72,5–) 217,5 (–471) µm de largura, (média entre dimensões: (80,9–) 210,5 (–480,8) µm). Portanto, pode-se inferir que as medidas das conidiomata obtidas dos isolados portugueses crescidos em PDA, estão de encontro às descrições de conidiomata feita por outros autores, sendo a média das dimensões de conidiomata portuguesas maiores. Em meio de cultivo MEA, os valores entre os isolados portugueses e australianos diferiram consideravelmente, sendo as conidiomata dos isolados portugueses menores. Ressalva-se que as conidiomata são estruturas de tamanhos muito variados, e por apresentarem textura viscosa, ao estarem próximas umas das outras, podem se unir, tornando-se maiores, e sendo assim, variando ainda mais suas dimensões.

Conídios

Os conídios (Figura 4.16b), são de forma e tamanho variados, retos ou levemente curvados, cilíndricos ou elipsoides, piriformes ou alantoides, hialinos e frequentemente

bigutulados, mas também multigutulados, e sem apêndices (Shuttleworth *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012).

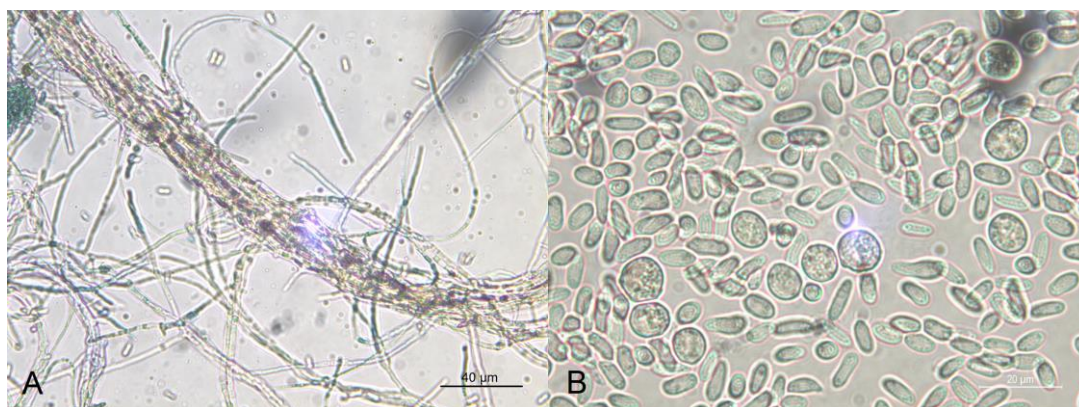


Figura 4.16. Morfologia de *G. smithogilvyi*, em PDA após 7 dias de incubação a 25 °C. A) Visão ao microscópio óptico dos micélios. B) Detalhe dos esporos (conídios).

O tamanho dos conídios sofreu pouca variação em função do meio de cultivo. De modo geral, as médias de comprimento variaram entre 5,7 µm (G1 em MEA) e 7,0 µm (G2 em MEA), todas as demais médias de comprimentos estão compreendidas na faixa dos 6 µm. Quanto as medidas de largura, a menor média foi de 2,3 µm (G3 em MC) e a maior 3,1 µm (G2 em MEA). Com exceção da média de largura em meio PDA, a estirpe G2 obteve as maiores médias de comprimento e de largura em todos os outros meios de cultura. Com exceção da média de largura em MC, a estirpe G1 obteve as menores médias de comprimento e de largura em todos os outros meios de cultura. O valor de todas as medições estão expressos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Medições de conídios de três isolados de *G. smithogilvyi* em três meios de cultivo. (DP: desvio padrão, n: número amostrado).

Meio de cultivo	Isolado	Medição do comprimento (µm)					Medição da largura (µm)				
		Mínimo	Média	Máximo	DP	n	Mínimo	Média	Máximo	DP	n
PDA	G1	3,5	6,2	8,2	0,9	110	1,9	2,6	3,2	0,3	111
	G2	5,2	6,9	8,4	0,7	100	1,9	2,8	3,6	0,3	104
	G3	4,3	6,7	9,2	0,9	100	1,6	3,0	4,0	0,5	105
	Média ± DP	4,4±0,9	6,6±0,3	8,6±0,5			1,8±0,2	2,8±0,2	3,6±0,4		
MEA	G1	3,9	5,7	7,7	0,7	165	2,1	2,7	3,2	0,2	108
	G2	4,8	7,0	9,4	0,9	107	2,0	3,1	3,9	0,4	109
	G3	5,3	6,7	8,6	0,8	117	1,6	2,9	3,6	0,4	105
	Média ± DP	4,7±0,7	6,5±0,7	8,7±0,9			1,9±0,3	2,9±0,2	3,6±0,4		
MC	G1	4,9	6,4	8,3	0,6	110	1,8	2,5	3,2	0,3	114
	G2	5,1	6,9	8,9	0,7	110	2,0	3,1	4,1	0,5	102
	G3	4,8	6,7	9,6	0,9	110	1,6	2,3	3,1	0,3	110
	Média ± DP	4,9±0,1	6,7±0,3	8,9±0,6			1,8±0,2	2,7±0,4	3,5±0,5		

Estes valores estão de acordo com as médias das dimensões de conídios descritas por diferentes autores, provenientes de isolados de *G. smithogilvyi* da Itália, Nova Zelândia, Austrália e Índia. A média das dimensões de conídios de estirpes italianas, descritas por Visentin *et al.* (2012), variaram entre 7,090 µm e 7,591 µm (comprimento) e 2,967 µm e 2,992 µm (largura), quando em meio de cultivo MEA. Os mesmos autores também descrevem um isolado neozelandês com média de comprimento 7,320 µm e de largura 3,355 µm. Os autores Shuttleworth *et al.* (2012), descrevem as médias de comprimento e de largura dos conídios de isolados australianos de *G. smithogilvyi*, em dois meios de cultivo diferentes. Em MEA, (6–) 8 (–9.5) µm para comprimento e (2–) 2.5 (–4) µm para largura. Em PDA, os valores variaram entre (6.5–) 7.5 (–9.5) µm para comprimento e (2–) 3 (–4) µm para largura. Na Índia, Dar & Rai (2015) descrevem os conídios de *G. smithogilvyi* crescido em PDA, com dimensões muito semelhantes aos australianos, variando entre (5.7–) 7.5 (–8.9) µm para comprimento e (2–) 3 (–4) µm para largura. Portanto, apesar dos valores de comprimento e largura dos conídios de *G. smithogilvyi* de outros países serem muito semelhantes aos obtidos neste estudo, pode-se inferir que os conídios das estirpes portuguesas apresentaram dimensões um pouco menores do que as estirpes anteriormente mencionadas, em todos os parâmetros, com exceção das médias de largura da estirpe australiana em meio MEA, para o qual a estirpe portuguesa apresentou maiores medidas.

4.2.2 Caracterização Ecofisiológica

Os três isolados de *G. smithogilvyi* crescidos em diferentes meios de cultivo (PDA, MEA e MC) e temperaturas (12, 20, 25, 30 e 35 °C), estão apresentados nas Figuras 4.17, 4.18 e 4.19. É possível observar uma notável diversidade macromorfológica entre as colônias de *G. smithogilvyi*, em função das condições de crescimento. Em meio PDA, destaca-se a coloração escura no verso das placas, principalmente dos isolados G1 e G3. Em MEA, micélios acinzentados e bordas bastante irregulares. Em MC, micélios muito proeminente, de tonalidade esverdeada a acinzentada.

Em relação a temperatura 5 °C, o fungo não apresentou crescimento micelial visível a olho nu em nenhum tratamento, porém, com o auxílio de uma lupa, observou-se que no local da inoculação havia esporos germinados, em todos os tratamento, ao final de 9 dias de incubação.

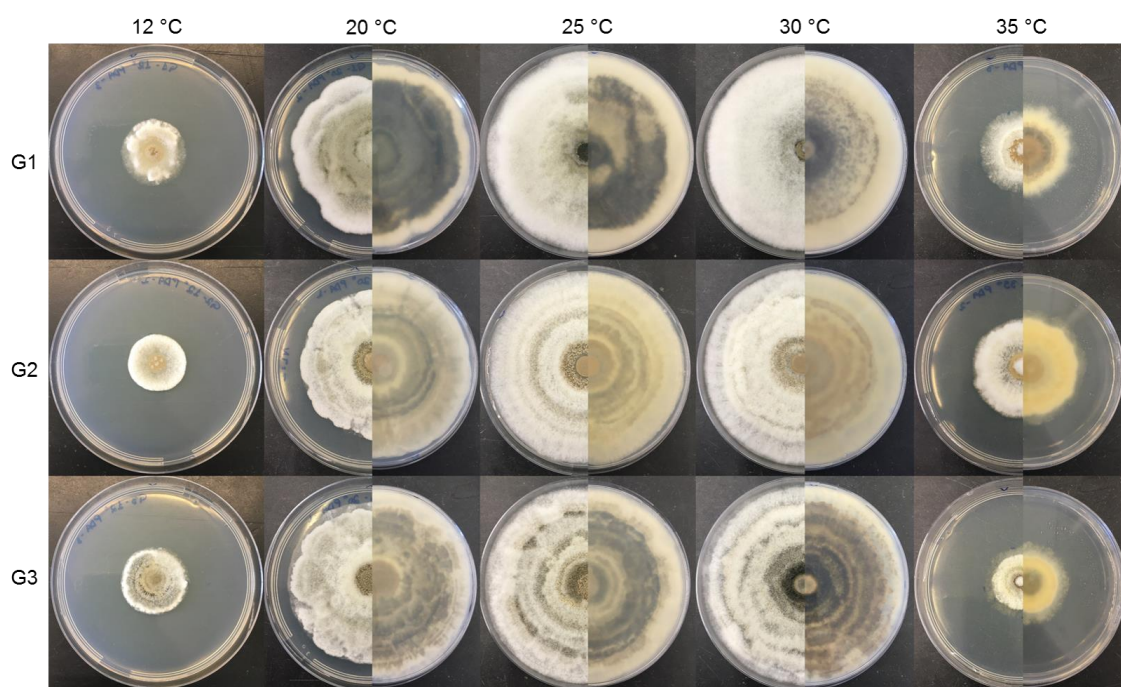


Figura 4.17. Crescimento de três isolados de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em 5 temperaturas (12, 20, 25, 30 e 35 °C) em meio PDA, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa (lado esquerdo) e perspectiva inferior (lado direito).

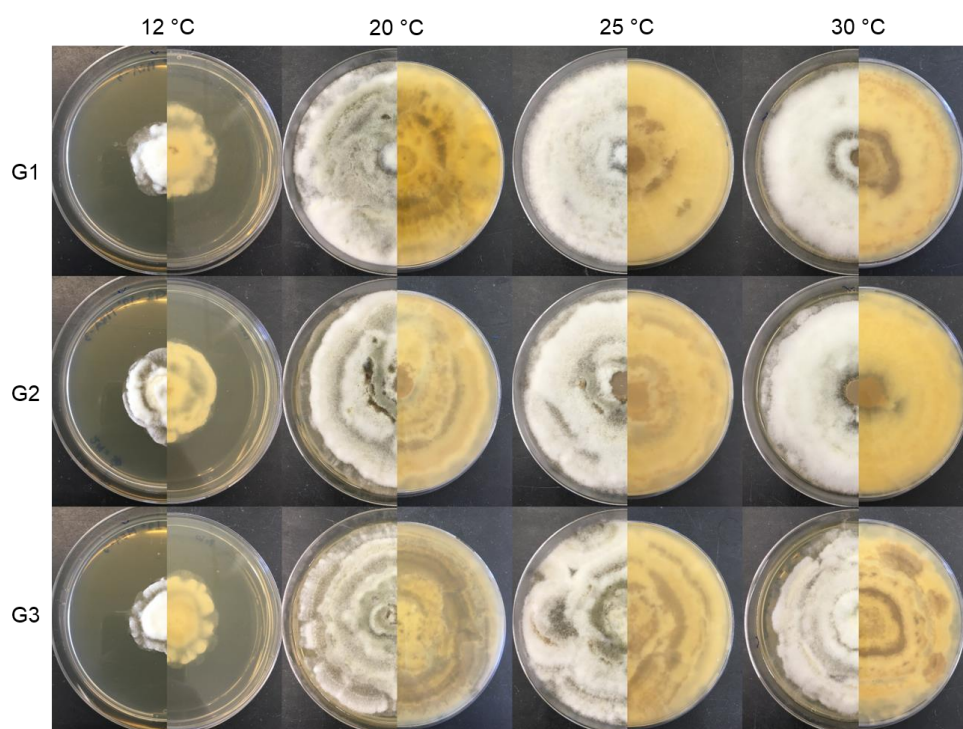


Figura 4.18. Crescimento de três isolados de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em 4 temperaturas (12, 20, 25 e 30 °C) em meio MEA, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa (lado esquerdo) e perspectiva inferior (lado direito).

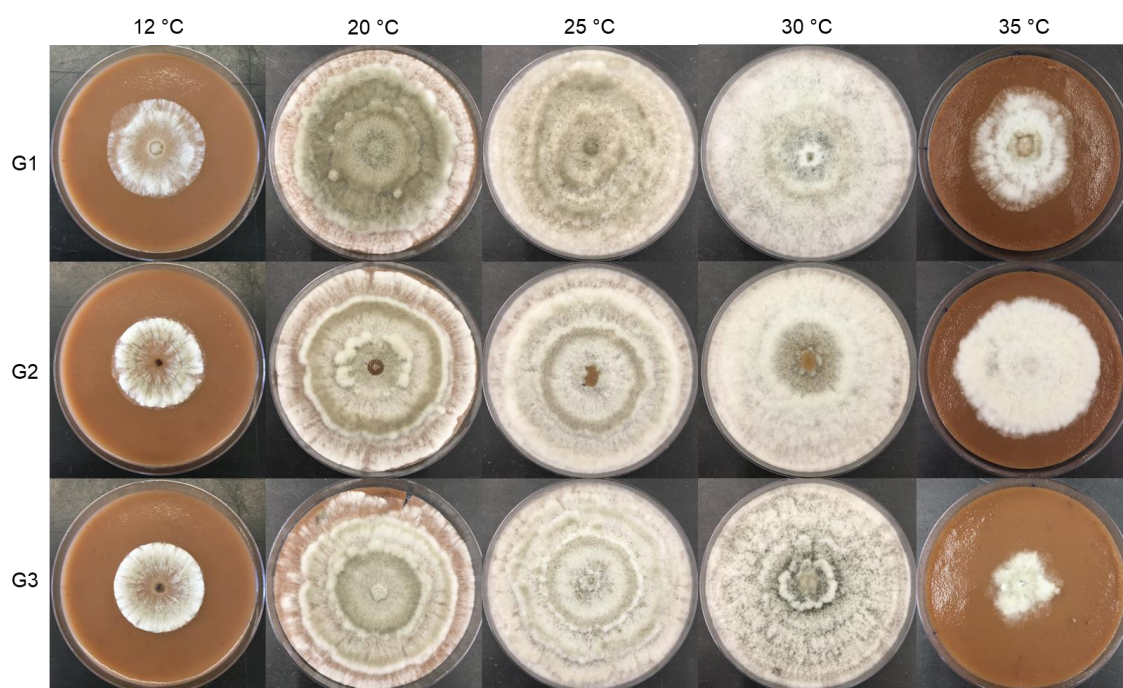


Figura 4.19. Crescimento de três isolados de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em 5 temperaturas (12, 20, 25, 30 e 35 °C) em MC, após 7 dias de incubação. Perspectiva superior da placa.

Duração da fase lag

As médias da fase *lag* (em dias) dos três isolados de *G. smithogilvyi* nos vários meios de cultura incubados a cinco temperaturas diferentes estão apresentados na Figura 4.20. As médias entre isolados foram agrupadas pelo fato de os isolados não apresentarem diferença significativa entre si ($p>0.05$, Anexo 1).

A fase *lag* representa o tempo (em dias) que o fungo demora até iniciar o seu crescimento nas diferentes condições testadas. Ou seja, uma fase *lag* curta reflete uma maior adaptação do fungo àquela condição (substrato ou temperatura), e uma maior capacidade de germinação e crescimento. Observou-se que a fase *lag* mais longa (9 dias para todos os meios de cultivo) deu-se na incubação a 5 °C (dados não apresentados), verificando-se a fase *lag* significativamente mais curta ($p=0.000$; Anexo 1) nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, relativamente às temperaturas de 12 e 35 °C. É de notar que a duração da fase *lag* em MC foi sempre menor relativamente aos restantes meios. Este fato pode estar relacionado com a composição nutricional do meio (à base de castanha), que parece favorecer o crescimento do fungo relativamente aos meios de cultura sintéticos. Não foram encontrados estudos que reportassem a duração da fase *lag* de *G. smithogilvyi*, para fins de comparação.

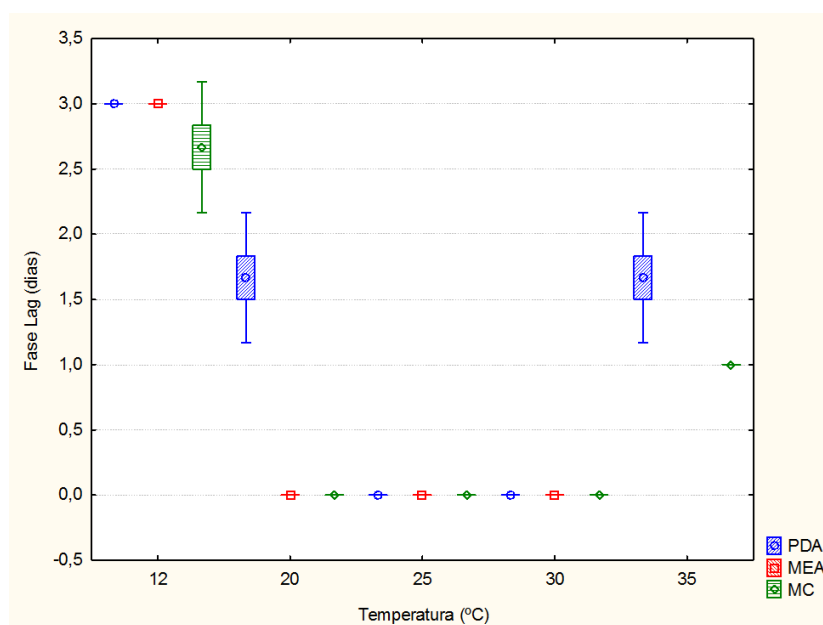


Figura 4.20. Duração da fase Lag em dias, da média das medições de três estirpes de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidas a diferentes temperaturas de incubação.

Taxa média de crescimento

Na Figura 4.21 são apresentados os resultados com as taxas médias de crescimento dos três isolados de *G. smithogilvyi* em cada um dos três meios de cultura, em função da temperatura de incubação. A temperatura ótima de crescimento dos três isolados de *G. smithogilvyi* variou entre os 25 e 30 °C (dependendo do isolado e do meio de cultivo), com taxas médias de crescimento diametral entre 3,5 e 6 mm/dia, embora não se tenham registado diferenças significativas entre 20, 25 e 30 °C ($p>0.05$, Anexo 1). Nas temperaturas de 12 e 35 °C o fungo apresentou taxas de crescimento significativamente mais baixas ($p=0.000$, Anexo 1), entre 1,5 e 3,5 mm/dia. O crescimento diário de *G. smithogilvyi* variou de forma pouco significativa entre os meios de cultivo PDA e MEA ($p=1.000$) e entre MEA e MC ($p=0.07$), mas a diferença foi significativa entre PDA e MC ($p=0.003$). No entanto, a taxa de crescimento diário dos três isolados do fungo foi sempre maior em MC, para todas as temperaturas de incubação.

Comparativamente ao estudo de Visentin *et al.* (2012), os autores descrevem a temperatura ótima de crescimento para isolados italianos de *G. smithogilvyi* (em meio MEA) também sendo de 25 °C, com um crescimento de 0,83 a 1,01 mm/dia. Portanto, os isolados portugueses e italianos tem a temperatura ótima de crescimento em comum, entretanto, nota-se que as colônias dos isolados portugueses crescem com uma taxa muito maior neste mesmo meio, sendo entre 3,8 e 4 mm/dia. Deve-se referir que a diferença nos valores obtidos para o crescimento pode ser justificada pela diferença no método de cálculo da taxa de crescimento, em que no presente estudo apenas foi considerada a fase logarítmica de crescimento (excluindo a fase lag e a fase estacionária).

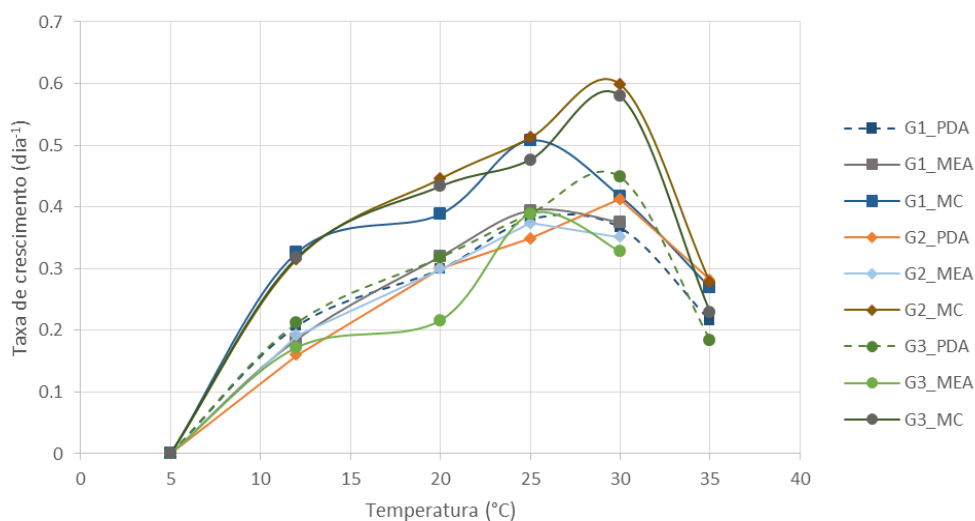


Figura 4.21. Taxa de crescimento diária (cm/dia) de três isolados de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidos a diferentes temperaturas de incubação (5, 12, 20, 25, 30 e 35 °C).

Produção de conídios

A quantidade de esporos produzidos não apresentou diferença significativa entre meios de cultura ($p=0.379$). Considerando as diferentes temperaturas, registraram-se algumas diferenças significativas entre temperaturas de incubação (Anexo 1). Este parâmetro variou entre 3,5 \log_{10} esporos/mL (em MC, incubação a 12 °C) e 9 \log_{10} esporos/mL (em MC, incubação a 30 °C). De modo geral, para meio de cultivo PDA e MC, a temperatura de incubação em que o fungo produziu mais esporos foi de 30 °C (8,5 e 9 \log_{10} esporos/mL, respectivamente para cada meio). Para o meio MEA a temperatura de incubação em que o fungo produziu maior quantidade de esporos foi de 25 °C (8 \log_{10} esporos/mL). Observa-se que *G. smithogilvyi* quando cultivado em MC e incubado a 12, 20, 25 e 35 °C, apresentou sempre a menor quantidade de esporos/mL, mas quando incubado a 30 °C, houve um pico de produção de esporos. Nota-se também que na incubação de 25 °C a variação da quantidade de esporos entre os meios foi a menor, mas quando a incubação se deu em 30 °C, a variação da quantidade de esporos/mL entre os meios foi a maior entre todas as temperaturas. Não foram encontrados estudos que reportassem a quantidade de esporos de *G. smithogilvyi* por colônia, para fins de comparação. Na Figura 4.22 são apresentados os resultados com as diferentes quantidades de esporos contabilizadas para cada meio de cultivo e temperatura de incubação.

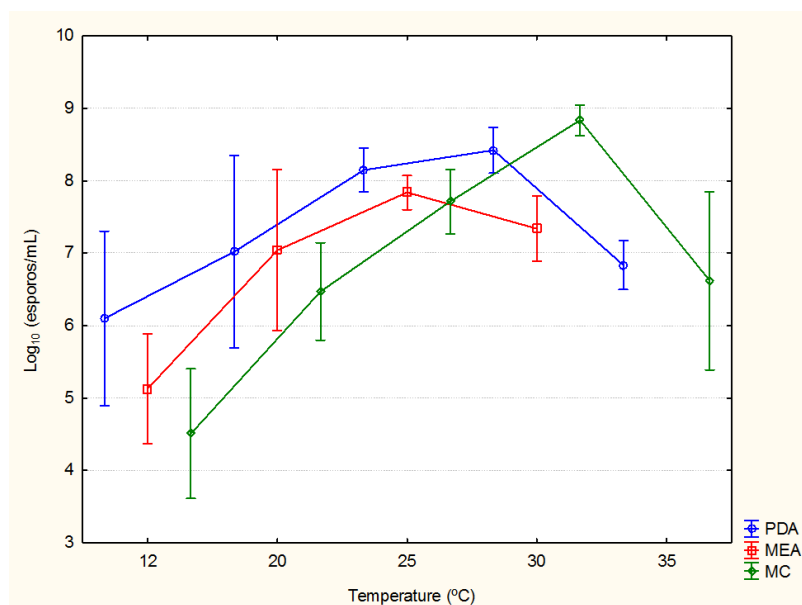


Figura 4.22. Média da contagem de esporos das três estirpes de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3) em três meios de crescimento (PDA, MEA e MC), submetidas a 5 temperaturas de incubação.

Conclusões da ecofisiologia de G. smithogilvyi

Em todos os testes, o patógeno *G. smithogilvyi* apresentou melhores respostas de desenvolvimento quando cultivado em meio base de castanha (MC), com a menor duração da fase *lag*, a maior taxa média de crescimento diário, e também a menor quantidade de esporos produzida por colônia. Tendo em vista que a maior produção de esporos está relacionado a um mecanismo de defesa dos fungos, em que situações de estresse estimulam a esporulação, a incubação a 30 °C em MC, no qual houve maior esporulação comparado aos demais meios de cultivo (PDA e MEA), pode refletir uma grande capacidade do fungo para se ajustar a esta condição tornando-se mais agressivo. Estes resultados confirmam a elevada adaptação do fungo à matriz em estudo, assim resultando numa elevada capacidade de infecção e desenvolvimento de podridão sob condições variáveis de temperatura. Esta capacidade ainda pode vir a refletir-se num aumento da sua virulência em condições de temperatura ambiente mais elevada, expectável no atual cenário de aquecimento global.

Também pode-se concluir que os isolados portugueses de *G. smithogilvyi* apresentam características comparáveis aos isolados naturais de outros países, diferindo um pouco quanto ao tamanho das conidíomata e conídios, e também na taxa de crescimento diária, apresentando crescimento mais rápido nas condições testadas.

4.2.3 Caracterização Molecular

Foi realizada a análise filogenética dos isolados portugueses de *G. smithogilvyi* G1, G2, G3 e G4 com base na sequência da região ITS e do gene *TEF1- α* . Nesta análise foram incluídas as sequências de outros isolados de *G. smithogilvyi* provenientes de 10 países diferentes, obtidas na plataforma GenBank (sequências de 20 isolados para a região ITS e 14 para o gene *TEF1- α*). *Gnomoniopsis paraclavulata* Sogonov foi usado como grupo externo. Nas Figuras 4.23 e 4.24 são apresentadas as eletroforeses em gel de agarose dos DNA's genômicos e dos produtos de PCR de três isolados de *G. smithogilvyi*, respectivamente. Na Figura 4.25 são apresentadas as árvores filogenéticas para a região ITS e para o gene *TEF1- α* .

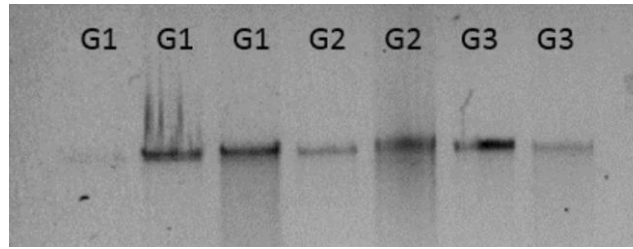


Figura 4.23. Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico de três isolados de *G. smithogilvyi* (três extrações de DNA para o isolado G1 e duas para G2 e G3, com diferentes qualidades).

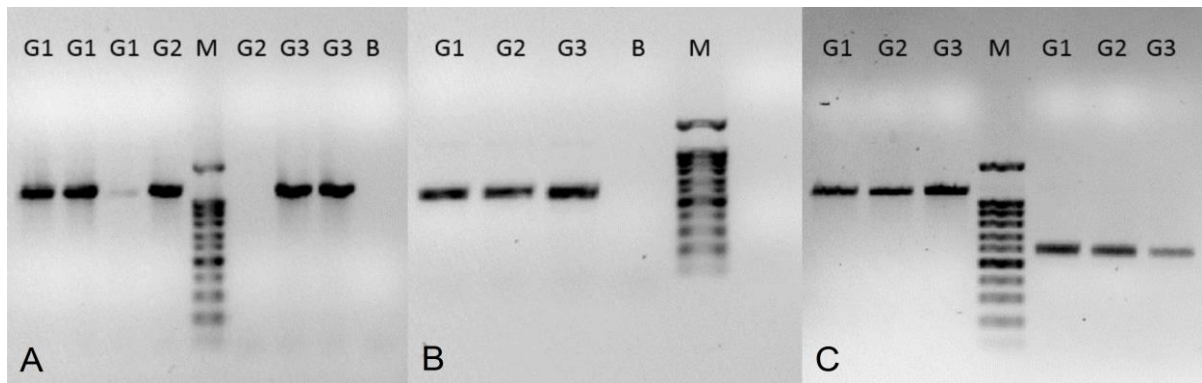
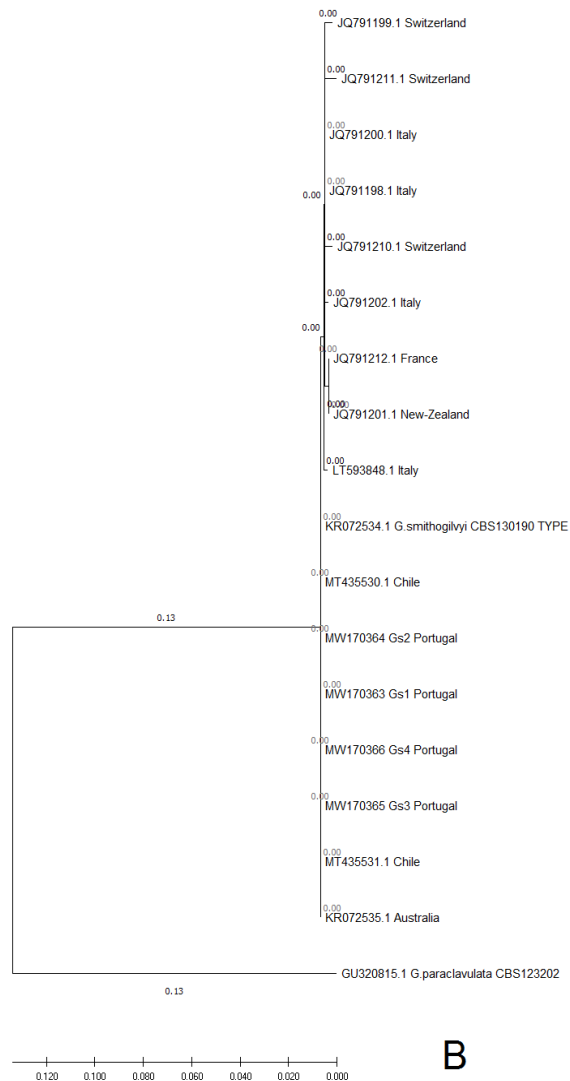


Figura 4.24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de três isolados de *G. smithogilvyi* (G1, G2 e G3). M: marcador de peso molecular (100 bp ladder); B: controle negativo da PCR. Amplificação do gene *TEF1-α* usando os *primers* EF1-728F/EF1-1567R. B) Amplificação da região ITS usando os *primers* ITS1/ITS4. C) Produtos de PCR após purificação. Gene *TEF1-α* do lado esquerdo do marcador e região ITS do lado direito.



B

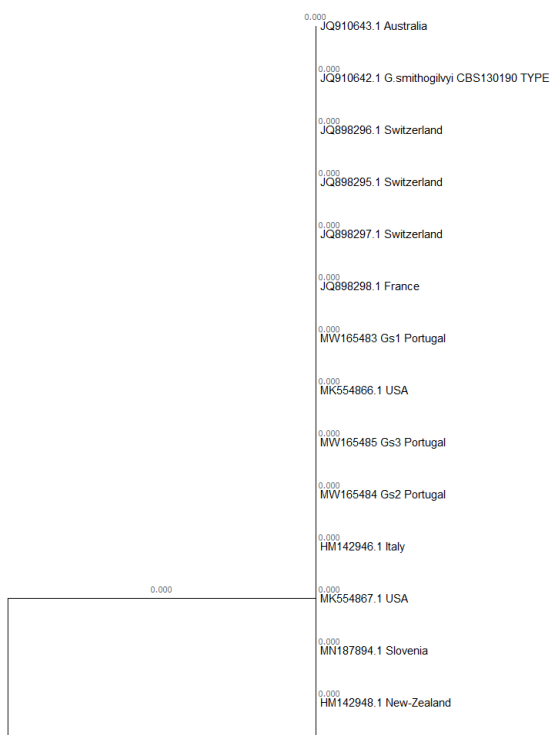


Figura 4.25. Análise evolutiva de *G.smithogilvyi* pelo método de máxima verossimilhança. A) Árvore filogenética para a região ITS. B) Árvore filogenética para o gene *TEF1-α*.

Os isolados da Austrália, Chile, Eslovênia, Espanha, EUA, França, Itália, Nova Zelândia, Reino Unido e Suíça compartilham >99% de identidade com os isolados portugueses, formando apenas um clado comum em relação à região ITS. Quanto ao gene *TEF1-α*, os isolados da França, Itália, Nova Zelândia e Suíça formaram subcamadas separadas dentro do clado em que os isolados portugueses estão inseridos. As semelhanças das sequências obtidas dos isolados deste estudo com as estirpes de *G. smithogilvyi* de outros países sugerem que de fato os isolados portugueses estudados são representantes desta espécie fúngica, não apresentando diferenças genéticas significativas para as duas sequências estudadas.

4.3 TESTES DE BIOCONTROLE

Levou-se em consideração no momento da avaliação os efeitos da interação entre os confrontamentos e o comportamento de crescimento dos fungos quando inseridos nos diferentes meios de cultura. Nas Figuras 4.26 e 4.27 são apresentadas as placas com os confrontamentos em meio PDA e MC, respectivamente.

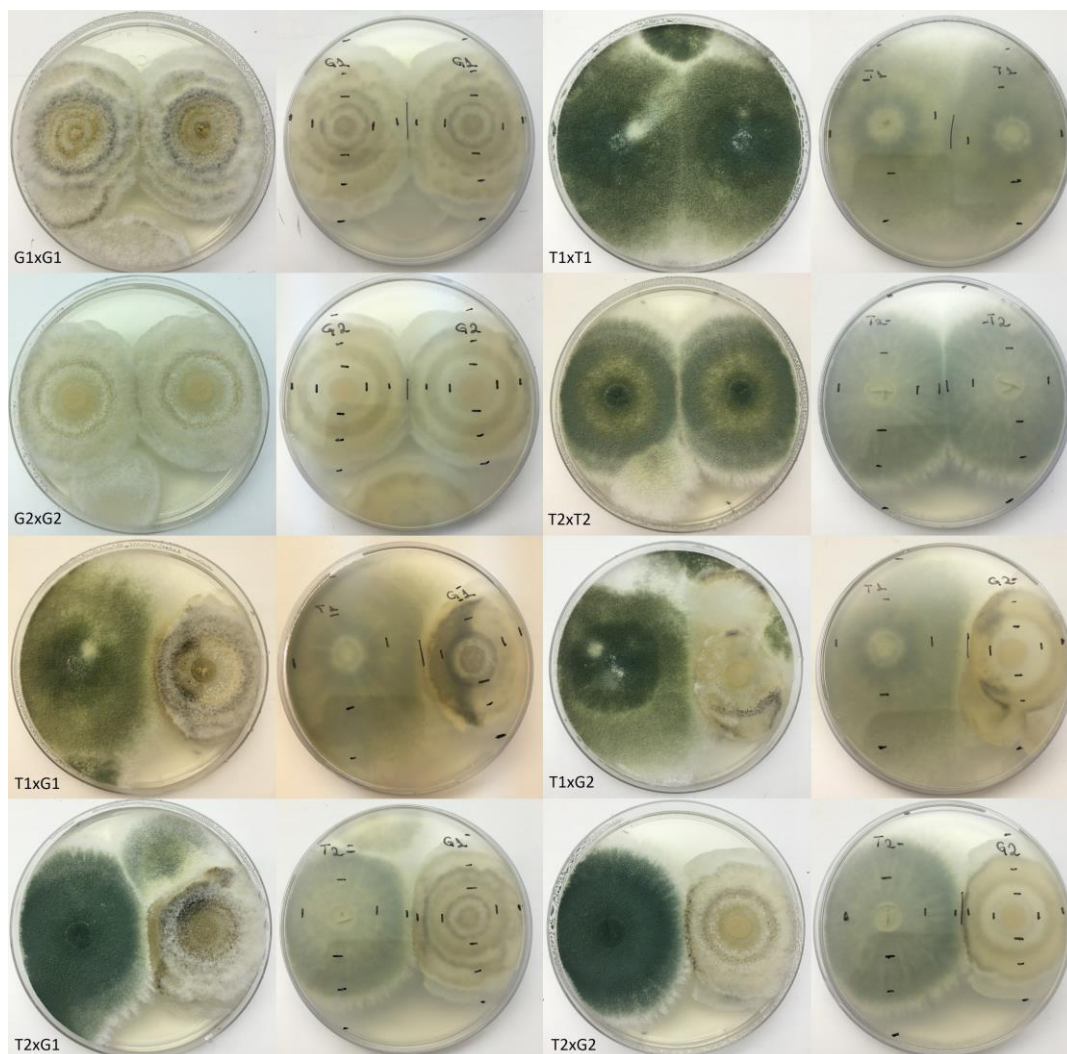


Figura 4.26. Teste de co-cultura em meio PDA, com 4 dias de incubação a 25 °C. Vista superior (direita) e inferior (esquerda) das colônias. G1 e G2: isolados de *Gnomoniopsis smithogilvyi*; T1 e T2: isolados de *Trichoderma viridescens*.

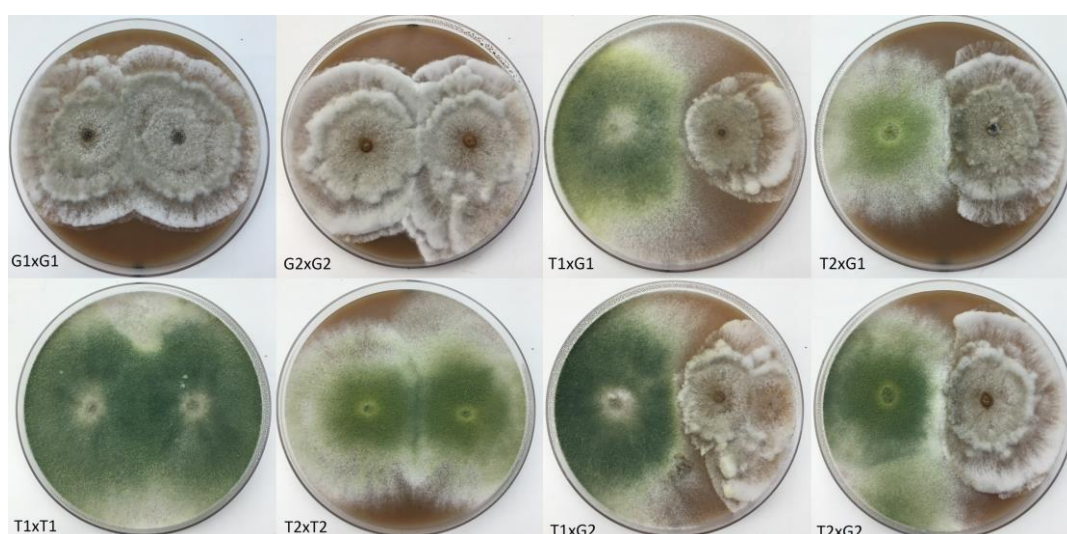


Figura 4.27. Teste de co-cultura em meio de castanha, com 4 dias de incubação a 25 °C. G1 e G2: isolados de *Gnomoniopsis smithogilvyi*; T1 e T2: isolados de *Trichoderma viridescens*.

A partir da análise estatística das dimensões de crescimento, geraram-se os gráficos relativos as medições longitudinais (Figura 4.28) e transversais (Figura 4.29).

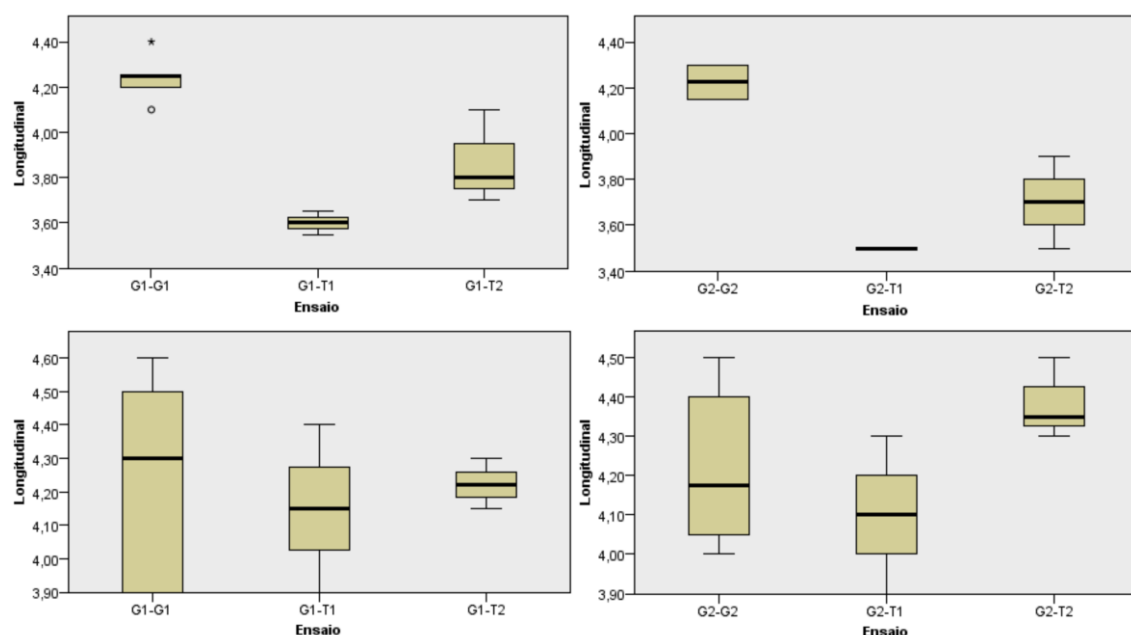


Figura 4.28. Crescimento longitudinal (diâmetro, em cm) dos isolados *G. smithoglyvi* (G1 e G2), quando confrontados consigo próprio (G1-G1 e G2-G2) e com *T. viridescens* (G1-T1, G1-T2, G2-T1, G2-T2). Superior direito: G1 em PDA; superior esquerdo: G2 em PDA; Inferior direito: G1 em MC; inferior esquerdo: G2 em MC.

Em relação aos crescimentos longitudinais, todos os confrontamentos do isolado G1 em meio PDA diferiram significativamente entre

si ($F=28,601$; $p=0,000$). Quanto ao isolado G2 em meio PDA, o controle (G2xG2) diferiu significativamente aos confrontamentos G2xT1 e G2xT2 ($F= 53,431$; $p=0,000$), mas estes dois não diferiram entre si. Já em MC, todos os confrontamento foram semelhantes entre si ($F=0,153$; $p=0,860$ para G1 e $F=1,865$; $p=0,210$ para G2). Portanto, com base nas medições de crescimento longitudinal das colônias, pode-se dizer que o efeito de controle de *T. viridescens* é notório em meio de cultivo PDA, onde existe um crescimento significativamente menor das colônia de G1 e de G2 em co-cultura com T1 e T2, comparativamente ao crescimento sem *T. viridescens*. Porém este efeito de controle não foi observado em MC.

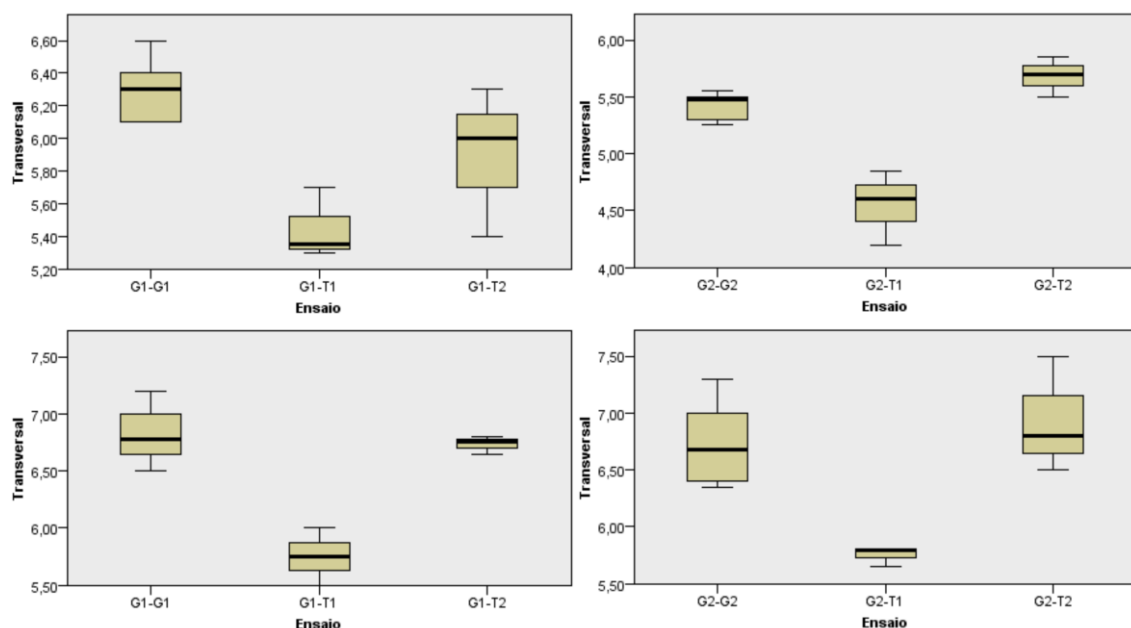


Figura 4.29. Crescimento transversal (diâmetro, em cm) dos isolados *G. smithogylvyi* (G1 e G2), quando confrontados consigo próprio (G1-G1 e G2-G2) e com *T. viridescens* (G1-T1, G1-T2, G2-T1, G2-T2). Superior direito: G1 em PDA; superior esquerdo: G2 em PDA; Inferior direito: G1 em MC; inferior esquerdo: G2 em MC.

Em relação aos crescimentos transversais, para o isolado G1 em PDA os confrontamentos G1xG1 e G1xT1 diferiram significativamente entre si ($F= 9,554$; $p=0,060$), mas G1xT2 foi semelhante a estes dois confrontamentos. Para G2 em PDA, o confrontamento G2xT1 diferiu significativamente do controle (G2xG2) e do confrontamento G2xT2 ($F= 28,405$; $p=0,000$), mas estes dois últimos foram significativamente semelhantes entre si. Quanto aos confrontamentos em MC, G1xT1 diferiu significativamente do controle (G1xG1) e do confrontamento G1xT2 ($F= 23,892$; $p=0,000$), mas estes dois últimos foram semelhantes entre si. Nos ensaios com o isolado G2 em MC, G2xT1 diferiu significativamente do controle (G2xG2) e do confrontamento G2xT2 ($F= 9,145$; $p=0,007$), mas estes dois últimos foram semelhantes entre si. Portanto, para as medições transversais, apenas os confrontamentos com o isolado T1 apresentaram crescimento significativamente menor das colônias de G1 e de G2, comparativamente ao crescimento sem *T. viridescens*. Este efeito foi observado tanto em meio PDA como em MC.

A Figura 4.30 apresenta a redução de crescimento de *G. smithogylvyi* observada em cada um dos confrontamentos testados, onde D1 representa a taxa de redução de crescimento diametral longitudinal da colônia, e D2 representa a taxa de redução transversal.

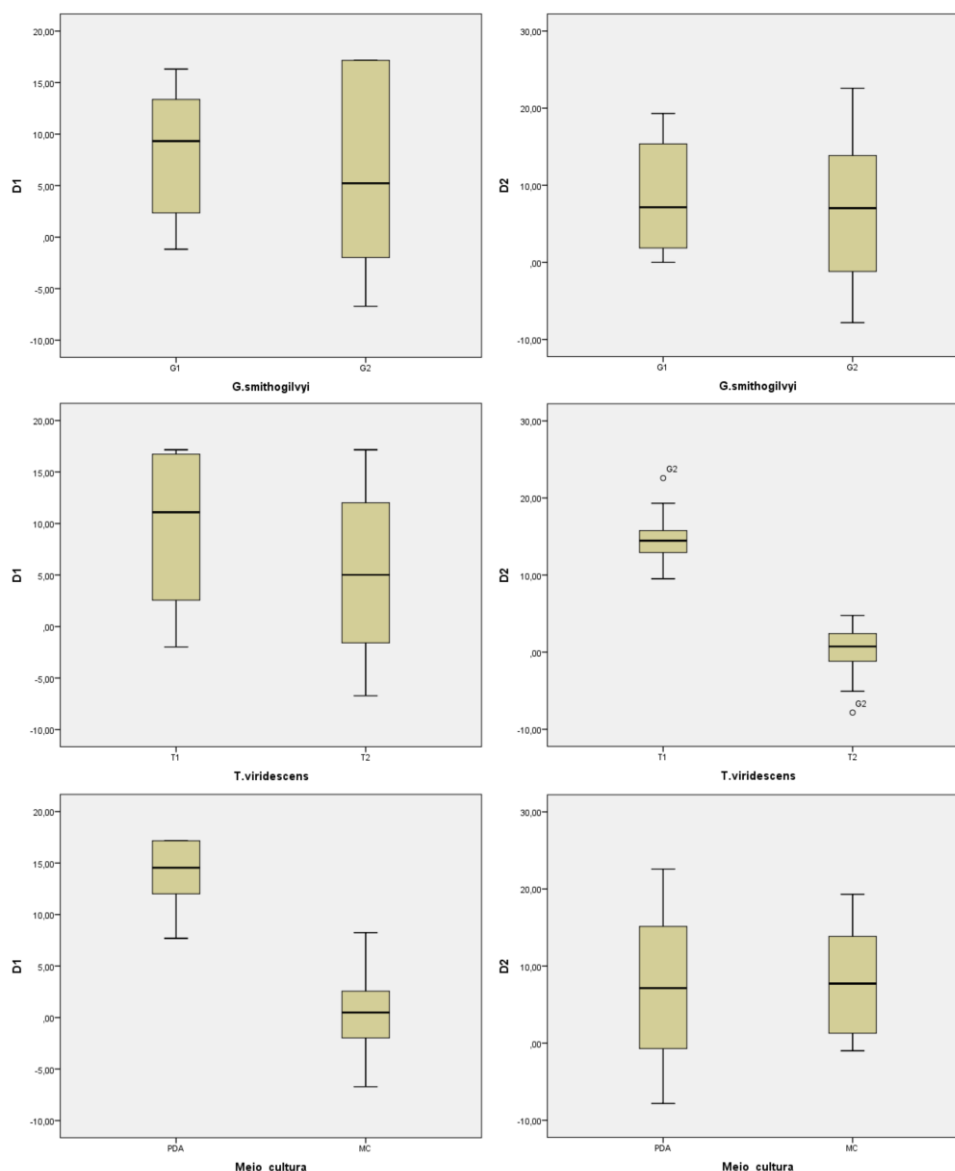


Figura 4.30. Redução de crescimento das medições longitudinais (D1) e transversais (D2), relativos aos dois isolados de *G. smithogilvyi* (superiores), aos dois isolados de *T. viridescens* (medianos) e aos dois meios de cultura (inferiores).

Não se verificou diferença significativa na redução de crescimento entre os dois isolados de *G. smithogilvyi* para D1 ($F=0,262$; $p=0,614$) e para D2 ($F=0,215$; $p=0,647$). Da mesma forma que observado nas medições de crescimento transversais, no gráfico de redução de crescimento, o isolado T1 de *T. viridescens* confirma ter efeito antagônico sobre *G. smithogilvyi* mais marcado que o isolado T2, mas é significativamente diferente apenas na direção D2 ($F=102,775$; $p=0,000$). Em relação aos meios de cultura, verificou-se diferença significativa para o valor D1 ($F=84,532$, $p=0,000$), mas não para D2 ($F=0,123$, $p=0,729$).

A redução de crescimento no sentido D1 é significativamente maior em meio PDA do que em MC, o que significa que o efeito de biocontrole dos isolados de *T.*

viridescens sobre o agente patogênico varia significativamente com o substrato. Neste caso, o efeito de controle no substrato base de castanha é menos marcado, o que permite concluir que o agente patogênico apresenta uma elevada adaptação à castanha, que lhe permite ultrapassar de forma mais eficiente o efeito de controle de *T. viridescens*.

De modo geral, observou-se em *T. viridescens* um arranque de crescimento micelial mais acelerado, chegando ao dobro da medida alcançada por *G. smithogilvyi* no dia 1 (Figura 4.31). É possível concluir que as reduções de crescimento de *G. smithogilvyi* decorreram principalmente pela competitividade de espaço físico para o desenvolvimento dos fungos na placa de Petri, e não efetivamente por uma ação química antagônica de *T. viridescens* sobre *G. smithogilvyi*. Serão necessários mais estudos com fungos antagônicos, incluindo o gênero *Trichoderma*, de modo a minimizar este problema, por meio da inoculação desfasada, por exemplo, no qual o fungo com crescimento mais lento, e neste caso *G. smithogilvyi*, é inoculado antes do agente antagônico. Além disso, e tendo em vista que os dois isolados de *T. viridescens* apresentaram capacidades antagônicas bastante diferentes, é possível que outros isolados do mesmo fungo tenham maiores capacidades antagônicas do que os estudados neste ensaio.

Destaca-se, novamente, algumas diferenças visuais nas características morfológicas das colônias decorrentes do meio de cultura. *G. smithogilvyi* apresenta um crescimento micelial mais volumosos e cotonosos quando em meio de castanha, por outro lado, a quantidade de bolsas de esporos presentes na colônia foi inferior, comparada com as colônias em meio PDA (Figura 4.32).

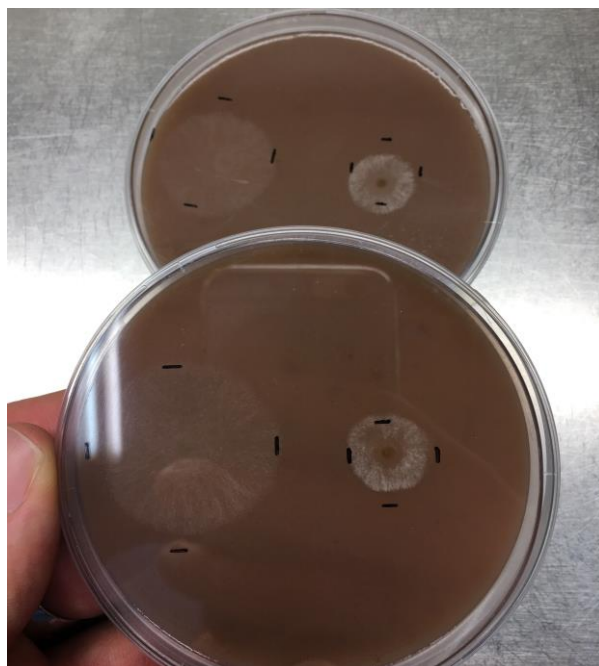


Figura 4.31. Teste de confrontamento entre *T. viridescens* e *G. smithogilvyi* após 24 horas de incubação. Nota-se a diferença na velocidade de crescimento entre os fungos. *T. viridescens* a esquerda e *G. smithogilvyi* a direita.



Figura 4.32. Diferenças morfológicas de *G. smithogilvyi* em MC (superiores) e em meio PDA (inferiores). Placas com 6 dias de incubação.

Aos 6 dias de incubação foi perceptível uma maior resistência por parte de *G. smithogilvyi* quando confrontada a estipe T2 de *T. viridescens*. Houve o surgimento de estruturas miceliais de coloração preta/acinzentada, muito densas e de textura rígida, na região de confronto dos fungos, dificultando o avanço do crescimento micelial de T2. Por outro lado, a estirpe T1 não estimulou o surgimento destas estruturas, invadindo as colônias de *G. smithogilvyi* e esporulando intensamente (Figura 4.33). Este efeito deverá

ser estudado no futuro, para avaliação de quais as diferenças estruturais ou metabólicas que as diferentes estirpes de *T. viridescens* espoletam em *G. smithogilvyi*, e se este efeito poderá ser explorado no combate ao desenvolvimento do agente causal da podridão da castanha.

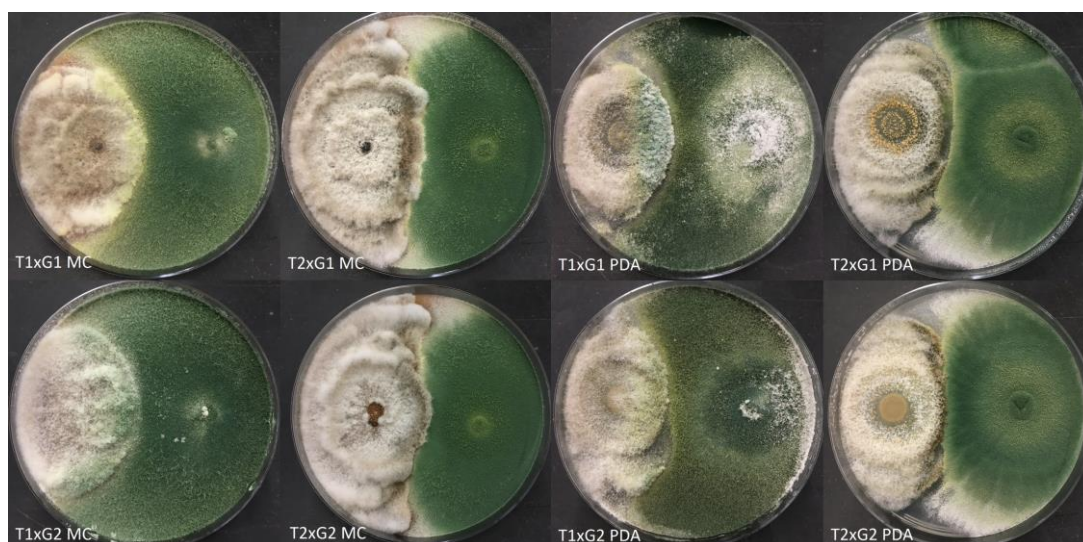


Figura 4.33. Teste co-cultura em MC e em meio PDA, após 6 dias de incubação.

5 CONCLUSÕES

A emergente incidência do fungo causador da podridão castanha em castanhas, recentemente identificado como *G. smithogilvyi*, vem preocupando produtores e indústrias do setor deste fruto, em diferentes países ao redor do mundo. Esta dissertação teve como foco caracterizar este agente isolado de castanhas em Portugal, morfológica, ecofisiológica e molecularmente, e determinar sua patogenicidade e virulência em variedades de castanhas portuguesas. Também foi conduzido um teste preliminar de biocontrole, utilizando o fungo *T. viridescens*. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo na identificação e caracterização deste agente causador da podridão da castanha em Portugal.

Como conclusões do presente estudo verifica-se que:

- *G. smithogilvyi* é o agente causal da podridão castanha em castanhas de Trás-os-Montes, Portugal, o que se confirmou por meio dos postulados de Koch;
- A patogenicidade de *G. smithogilvyi* em castanhas depende principalmente de uma porta de entrada no fruto ou da pré-existência do fungo no interior da castanha. O fungo se mostrou incapaz de penetrar a casca de castanhas sadias e bem-formadas. Porém, quando danificadas, o fungo foi invariavelmente capaz de reproduzir a doença em todas as castanhas inoculadas artificialmente;

Esta característica salienta a importância das boas práticas no manejo dos sotos, assim como os cuidados de pré, durante e pós colheita, no intuito de prevenir a ocorrência de pragas que possam vir a danificar os frutos e evitar danos físicos na casca, os quais favoreceriam o desenvolvimento da podridão castanha, entre outras doenças fúngicas.

- A virulência de *G. smithogilvyi* se mostrou muito elevada em castanhas previamente feridas, quando inoculadas artificialmente, sendo capaz de deteriorar completamente o interior dos frutos em apenas 15 dias de incubação;

Ressalva-se que 15 dias de incubação foi o menor tempo de incubação testado. Portanto a virulência de *G. smithogilvyi* pode ser ainda mais agressiva, sendo necessário

outros estudos com tempos de incubação menores para se dizer com precisão qual a gravidade da doença que este agente pode causar em castanhas.

- Não foi observada resistência ou tolerância a infecção por *G. smithogilvyi* entre nenhuma das três variedades de castanhas estudadas (Judia, Longal e Martaínha);
- *G. smithogilvyi* é um fungo endofítico e encontra-se aparentemente presente nos soutos de Trás-os-Montes, de maneira semelhante, entre as três variedades de castanha estudadas (Judia, Longal e Martaínha);

A desinfecção superficial das castanhas com hipoclorito de sódio e a exposição a luz UV não se mostrou eficiente na eliminação do fungo interno, sendo necessária a realização de mais estudos que visem a eliminação de fungos endofíticos em castanhas destinadas ao armazenamento, como técnicas de radiofrequência (RF) e uso de ozônio. Sugere-se também, para trabalhos futuros, o estudo mais abrangente dos soutos da região produtora de Trás-os-Montes, e o levantamento da quantidade de castanheiros contaminados principalmente por *G. smithogilvyi* além de outros agentes endofíticos, para que medidas preventivas e de controle possam ser tomadas com maior ênfase pelos produtores dos quais os soutos estejam mais comprometidos, e que as indústrias possam priorizar a aquisição de castanhas por aqueles soutos cuja sanidade das árvores é maior.

- Por meio das análises filogenéticas, identificou-se que os isolados portugueses de *G. smithogilvyi* sequenciados são geneticamente muito semelhantes aos isolados provenientes de outras regiões do mundo, mesmo fora da Europa, como aos isolados da Austrália, Chile e EUA, todos agrupados em um mesmo clado;
- As características morfológicas e ecofisiológicas dos isolados portugueses estudados estão em concordância com as mesmas características descritas para isolados de outros países, como Índia, Itália e Nova Zelândia;
- O teste de biocontrole mostrou que *T. viridescens* provocou redução de crescimento de *G. smithogilvyi*, principalmente em meio de cultivo exógeno (PDA), porém, são necessários mais estudos para averiguar se esta redução foi de fato um efeito antagônico de *T. viridescens* sobre o

patógeno, ou foi resultado da competitividade de espaço de crescimento na placa, em função da taxa de crescimento diário de *T. viridescens* ser maior. Caso o efeito seja de antagonismo, sugere-se estudos para determinar quais mecanismos antagônicos estão presentes nesta relação, como por exemplo um efeito micófago, a liberação de exsudados ou de compostos voláteis;

- *G. smithogilvyi* é um fungo altamente adaptado ao desenvolvimento em castanhas;

Este estudo incluiu nos testes de ecofisiologia e de biocontrole um meio a base de castanhas, para averiguar a interação do patógeno com o substrato, e de fato observou-se que o desenvolvimento do fungo neste meio, tanto na duração da fase lag, a taxa média de crescimento, a produção de esporos e o desempenho do fungo nos teste de co-cultura com *T. viridescens*, apresentaram melhores resultados, comparativamente aos mesmos testes conduzidos em meio exógeno PDA e MEA.

O objetivo geral deste estudo foi obter informações sobre o principal agente causal da podridão castanhas em Trás-os-Montes, para o futuro aprimoramento de estratégias de prevenção e redução de incidência desta doença, assim como as consequentes perdas de qualidade das castanhas associadas em armazenamento. Sugere-se como desenvolvimento de trabalhos futuros, o estudo da patogenicidade e virulência de *G. smithogilvyi* em castanhas incubadas em diferentes temperaturas, tendo em vista que este estudo averiguou apenas estas características a 25 °C. Sendo assim, seria possível identificar a quais temperaturas a virulência de *G. smithogilvyi* declinaria satisfatoriamente, para que as indústrias apliquem apenas o resfriamento necessário e adequado durante o armazenamento, sem que haja demasiado gasto econômico neste sentido. Também se faz necessário o estudo de outros patógenos deteriorantes de castanhas, e que apresentam relativa importância em Trás-os-Montes, como *Mucor racemosus* f. *sphaerosporus*, *Penicillium* spp, *Ciboria batschiana*, *Botrytis cinerea*, entre outros.

6 REFERÊNCIAS

- Álvarez, S., (2010). La castaña como produto de calidad en El Bierzo. In: Fernández-Manso, A., Martínez, C., Nespral, A., 2010. Un futuro para el castaño. Estudios sobre el castaño en la comarca de El Bierzo. ISBN978-84-614-1807-7.
- Baltazar, E.C.S. (2015). Otimização de protocolos de micropropagação de *Castanea sativa* Mill e estudo da tolerância de genótipos de castanheiro à doença da tinta. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Barreira, J.C.M., Casal, S., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, M.B.P.P., Pereira, J.A. (2009). Nutritional, fatty acid and triacylglycerol profiles of *Castanea sativa* Mill. cultivars: a compositional and chemometric approach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 2836–2842.
- Baryshev, G.K., Pantsyrnyy, V.I., Biryukov, A.P., Surin, V.I. (2014). Electrophysical properties of Cu-Nb composites. Part 1. The methodology of analysis of electrophysical properties of composites and samples' characteristics. *Tsvetnye Mentally*, 195(2), 76–80.
- Bento, A., Pereira, S., Pereira, A., (2007). Pragas associadas à castanha em Trás-os-Montes: biologia e estragos. In II Congresso Ibérico do Castanheiro. Vila Real. pp. 254-258.
- Bento. A., Cabanas, E., Rodrigues, A., Pereira, A., (2005). Avaliação dos estragos provocados por pragas da castanha em Trás-os-Montes. IV Congresso Nacional de Entomologia Aplicada, X Jornadas Científicas de la S.E.E.A., I Jornadas Portuguesas de Entomologia Aplicada. 17 a 21 de Outubro de 2005.
- Borges, O.M.P. (2007). Avaliação e Caracterização de Variedades de Castanheiro na Área da DRAP Norte. 49.
- Bounos, G. (2001). Inventory of Chestnut Research, Germplasm and References. Recuperado 22 de outubro de 2020, de (<http://www.fao.org/3/ad235e/ad235e00.htm>).
- Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Santos, N. (2009) Factors influencing the incidence and spread of chestnut blight in northeastern Portugal. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 53-59.
- Carbone, I., Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556. (<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>).
- CE (1996). REGULAMENTO (CE) Nº 1107/96 DA COMISSÃO de 12 de Junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 148: 1-10.
- Chandelier, A., Massot, M., Fabreguettes, O., Gischer, F., Teng, F., & Robin, C. (2018). Early detection of *Cryphonectria parasitica* by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 29–46 (<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1538-0>).
- Coelho, V., Gouveia, E., (2017). Fungos associados com as podridões da castanha. I Congresso Luso-Brasileiro de Horticultura. Lisboa, 1-4 Novembro, Livro de resumos, p. 162.

- Conedera, M., Jermini M., Sassella, A., Sieber, T. (2005). Raccolta, trattamento e conservazione delle castagne. Tecniche applicative e loro efficacia. Sherwood 108: 17-23.
- Conedera, M., Manetti, M. C., Giudici, F., & Amorini, E. (2004). Distribution and economic potential of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia Mediterranea*, 30(2), 179–193.
- Cuamba, M.U. (2020). Importância dos fatores bióticos (pragas e doenças) em pré-colheita na qualidade e conservação da castanha. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, 79 pp.
- Dar, M.A., Rai, M.K. (2015). *Gnomoniopsis smithogilvyi* a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report. *Mycosphere*, 6(3), 327–336.
- Dennert, F.G., Broggini, G.A.L., Gessler, C., Storari, M. (2015). *Gnomoniopsis castanea* is the main agent of chestnut nut rot in Switzerland. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 41–53.
- Donis-González, I.R., (2008). Management of microbial decay of fresh and peeled chestnuts in Michigan. Master Thesis. Michigan State University, 147 pp.
- Donis-González, I.R., Guyer, D.E., Fulbright, D.W. (2016). Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4514–4522.
- Driss, J.O. (2019) Chestnut rots: disease incidence and molecular identification of causal agents. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biotecnológica, Instituto Politécnico de Bragança, 53 pp.
- EPPO (2017). EPPO reporting service no 02–2017 Num. Article : 2017/047, European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- FAO (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), ‘Production of Chestnut by countries’, Statistics Division.
- Hou, L., Kou, X., Li, R., Wang, S. (2018). Thermal inactivation of fungi in chestnuts by hot air assisted radiofrequency treatments. *Food Control*, 93, 297–304.
- Laranjo, J., Cardoso, J., Portela, E., Abreu, C. (2007). *Castanheiros*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Ed. 380 p. Vila Real.
- Laranjo, G., Peixoto, F., Cardoso, F. (2009). “Castanheiros, técnicas e práticas”, Vila Real, Pulido Consulting – Indústria Criativa & Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Gentile, S., Valentino, D., Visentin, I., & Tamietti, G. (2009). *Discula pascoe* infections of sweet chestnut fruits in North-West Italy. *Australian Nutgrower*, 23, 23–25.
- Gentile, S., Valentino, D., Visentin, I., Tamietti, G. (2010). An epidemic of *Gnomonia pascoe* on nuts of *Castanea sativa* in the Cuneo area. *Proc. 1st European Congress on Chestnut - Castanea 2009*. Eds. G. Bounous and G.L. Beccaro. *Acta Horticulturae*, 866, 363–368.
- Gonçalves, B., Borges, O., Costa, H.S., Bennett, R., Santos, M., Silva, A.P. (2010). A metabolite of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fiber, organic acids, and phenolics. *Food Chemistry*, 122(1), 154–160.
- INE (2018). *Estatísticas Agrícolas*, Instituto Nacional de Estatística, Portugal.

- Jermini, M., Conedera, M., Sieber, T. N., Sassella, A., Schärer, H., Jelmini, G., Höhn, E. (2006). Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 877–885. (<https://doi.org/10.1002/jsfa.2428>).
- Jukes, T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lewis, A., Gorton, C., Rees, H., Webber, J. Perez-Sierra, A. (2017). First report of *Gnomoniopsis smithogilvyi* causing lesions and cankers of sweet chestnut in the United Kingdom. *New Disease Report* 35(20) (<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.035.020>).
- Lione, G., Danti, R., Fernandez-Conradi, P., Ferreira-Cardoso, J.V., Lefort, F., Marques, G., Meyer, J.B., Prospero, S., Radócz, L., Robin, C., Turchetti, T., Vettraino, A.M., Gonthier, P. (2019). The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: The challenge posed by a versatile fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 671–685. (<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1597-2>).
- Lione, G., Giordano, L., Sillo, F., Gonthier, P. (2015). Testing and modelling the effects of climate on the incidence of the emergent nut rot agent of chestnut *Gnomoniopsis castanea*. *Plant Pathology*, 64(4), 852–863.
- Magro, P., Speranza, S., Stacchiotti, M., Martignoni, D., Paparatti, B. (2010). *Gnomoniopsis* associated with necrosis of leaves and chestnut galls induced by *Dryocosmus kuriphilus*. *Plant Pathology*, 59(6), 1171.
- Maresi, G., Oliveira Longa, C.M., Turchetti T. (2013). Brown rot on nuts of *Castanea sativa* Mill: An emerging disease and its causal agent. *IForest*, 6(5), 294–301.
- Mariano, R.L.R. (1993). Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. I, p. 369-409.
- Matos, A. (2003). O Sistema de Comercialização de Castanha da Terra Fria Transmontana e Sua Cadeia de Valor. Dissertação de Mestrado. UTAD. Vila Real.
- Moscetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Haff, R.P., Contini, M., Massantini, R. (2014). Detection of Mold-Damaged Chestnuts by Near-Infrared Spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 83–90.
- Oztekin, S., Zorlugenç, B., Zorlugenç, F.K. (2006), Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, 75, 396-399.
- Pasche, S., Calmin, G., Auderset, G., Crovadore, J., Pelleteret, P., Mauch-Mani, B., Barja, F., Paul, B., Jermini, M., Lefort, F. (2016a). *Gnomoniopsis smithogilvyi* causes chestnut canker symptoms in *Castanea sativa* shoots in Switzerland. *Fungal Genetics and Biology*, 87, 9–21.
- Pasche, S., Crovadore, J., Pelleteret, P., Jermini, M., Mauch-Mani, B., Oszako, T., & Lefort, F. (2016b). Biological control of the latent pathogen *Gnomoniopsis*

- smithogilyvi in European chestnut grafting scions using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiology*, 75, 113–122.
- Rehner, S.A., Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*, 97(1), 84–98. (<https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>).
- Rodrigues, P. (2010). Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialization. Dissertação de Doutoramento, Escola de Engenharia, Universidade do Minho,.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. (2013). Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 197–209
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. (2018). Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 32–37.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Varlese, R., Aliberti, A., Carpenito, S., Woo, S.L., Scala, F., Lorito, M. (2016). New tools to improve the shelf life of chestnut fruit during storage. *Acta Horticulturae*, 1144, 309–315.
- Sakalidis, M.L., Fulbright, D.W., Kolp, M. Medina Mora, C. (2019). First report of *Gnomoniopsis smithogilyvi* causing chestnut brown rot on chestnut fruit in Michigan. *Plant Disease (Disease Notes)*, 103(8) (<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0562-PDN>).
- Serrano, J.F., Fernández, P.J.S., Rodríguez, J.A.S., Gutiérrez, F.J.P., Martínéz, P.M. (2001). *El Castaño: Manual y guía didáctica*. Instituto de Restauración y Medio Ambiente, León, Spain.
- Seddaiu, S., Cerboneschi, A., Sechi, C., Mello, A. (2017). *Gnomoniopsis castaneae* associated with *Dryocosmus kuriphilus* galls in chestnut stands in Sardinia (Italy). *iForest*, 10(2), 440–445.
- Shuttleworth, L.A., Guest, D.I., Walker, D.M. (2018). The fungus, the Code and the mysterious publication date: Why *Gnomoniopsis smithogilyvi* is still the correct name for the chestnut rot fungus. *IMA Fungus*, 9(2), 78–79.
- Shuttleworth, L.A., Guest, D.I. (2017). The infection process of chestnut rot, an important disease caused by *Gnomoniopsis smithogilyvi* (Gnomoniaceae, Diaporthales) in Oceania and Europe. *Australasian Plant Pathology*, 46(5), 397–405.
- Shuttleworth, L.A., Guest, D.I., Liew, E.C.Y. (2012). Fungal Planet Description Sheet 107: *Gnomoniopsis smithogilyvi*. *Persoonia*, 28, 142–143.
- Shuttleworth, L.A., Liew, E.C.Y., Guest, D.I. (2013). Survey of the incidence of chestnut rot in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 42, 63–72.
- Sieber, T.N., Jermini, M., Conedera, M. (2007). Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and molds. *Journal of Phytopathology*, 155(7–8), 497–504.
- Sillo, F., Giordano, L., Zampieri, E., Lione, G., De Cesare, S., Gonthier, P. (2017). HRM analysis provides insights on the reproduction mode and the population structure of *Gnomoniopsis castaneae* in Europe. *Plant Pathology*, 66(2), 293–303.

- Smith, H., Ogilvy, D. (2008). Nut rot in chestnuts. *The Australian Nutgrower*, 22, 10– 15.
- Smith, H.C., Agri, M. (2008). The life cycle, pathology, and taxonomy of two diferente nut rot fungi in chestnut. *The Australian Nut grower*, 22, 11-15.
- Sneath, P.H.A., Sokal R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Sogonov, M.V., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Mejía, L.C., White, J.F. (2008) Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Studies in Mycology*, 62, 1-77 (<https://doi.org/10.3114/sim.2008.62.01>).
- South, K.A., Hand, F.P., Jones, M.L. 2020. Beneficial Bacteria Identified for the Control of *Botrytis cinerea* in Petunia Greenhouse Production. *Plant Disease* 104, 1801-1810.
- Terrón, A. (2010). Micorrización y Producción de Hongos en los Sotos de Castaños Bercianos. In: Manso, A. F., Martínez, C., Nespral, A. *Un Futuro para el Castaño. Estudios sobre el castaño em la comarca de El Bierzo*. 98-107.
- Trapiello, E., Feito, I., González, A.J. (2017). First report of *Gnomoniopsis castaneae* causing canker on hybrid plants of *Castanea sativa* x *C. crenata* in Spain. *Plant Disease* 102(5). (<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1874-PDN>).
- Vasconcelos, M.C.B.M., Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., Ferreira-Cardoso, J.V. (2010). The composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1578–1589.
- Vettraino, A.M., Paolacci, A., Vannini, A. (2005). Endophytism of *Sclerotinia pseudotuberosa*: PCR assay for specific detection in chestnut tissues. *Mycological Research*, 109, 96-102.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G., Cardinale, F. (2012). *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as a causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology*, 94(2), 411–419.
- Walker, D.M., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Sogonov, M.V., White, J.F. (2010) Systematics of genus *Gnomoniopsis* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on a three gene phylogeny, host associations and morphology. *Mycologia*, 102, 1479–1496. (<https://doi.org/10.3852/10-002>).
- Wells, J.M. (1980). Mycoflora and Market Quality of Chestnuts Treated with Hot Water to Control the Chestnut Weevil. *Plant Disease*, 64(11), 999. <https://doi.org/10.1094/PD-64-999>.
- Wells, J.M., Payne, J.A. (1975). Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* Isolate from Weevil-Damaged Chestnuts. *Applied Microbiology*, 30, 536–540.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. in *PCR Protocols* (p. 315–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.

ANEXOS

Anexo 1. Análise estatística dos parâmetros produção de esporos, duração da fase lag e taxa de crescimento para os três meios de cultura (MEA, MC e PDA), considerando os fatores estirpe (G1, G2 e G3) e temperatura (12, 20, 25, 30, 35 °C), obtida pelo método de comparação múltipla de Kruskal-Wallis.

Meio de cultura	Fator	Parâmetro de crescimento	Kruskal-Wallis (H)	Valor de P (Teste de comparação múltipla)
PDA	Estirpe	Esporos	2.650	> 0.05
		Fase lag	0.2070	> 0.05
		Taxa de crescimento	0.062	> 0.05
	Temperatura	Esporos	20.597	0.0004 (12 ≠ 25; 12≠ 30; 30 ≠ 35)
		Fase lag	41.929	0.0001 (12 ≠ 25; 12≠ 30; 20≠ 25; 20≠ 30; 25≠ 35; 30≠ 35;)
		Taxa de crescimento	39.5066	0.0000 (12 ≠ 25; 12 ≠ 30; 25 ≠ 35; 30 ≠ 35)
MEA	Estirpe	Esporos	1.26	> 0.05
		Fase lag	0.000	> 0.05
		Taxa de crescimento	3.329	> 0.05
	Temperatura	Esporos	14.833	0.0020 (12 ≠ 25)
		Fase lag	35.000	0.0000 (todos diferentes exceto: 20=25; 20=30; 25=30)
		Taxa de crescimento	29.26	0.0000 (12 ≠ 25; 12 ≠ 30; 20 ≠ 25)
MC	Estirpe	Esporos	0.29	> 0.05
		Fase lag	0.0606	> 0.05
		Taxa de crescimento	2.871	> 0.05
	Temperatura	Esporos	43.6965	0.0000 (12 ≠ 25; 12≠ 30; 20 ≠ 25)
		Fase lag	24.191	0.0001 (12 ≠ 20; 12≠ 25; 12≠ 30; 20 ≠ 35; 25≠ 35; 30≠ 35;)
		Taxa de crescimento	38.99	0.0000 (12 ≠ 25; 12 ≠ 30; 25 ≠ 35; 30 ≠ 35)